



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**Caracterización de la proteína conjugadora de  
ubiquitina Ubc1 de *Leishmania infantum* en  
promastigotes *wild type* y *knock-in***

**TESIS DOCTORAL**

**Jaime Larraga Criado**

**Madrid, 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Centro de Investigaciones Biológicas

# **Caracterización de la proteína conjugadora de ubiquitina Ubc1 de *Leishmania infantum* en promastigotes *wild type* y *knock-in***

TESIS DOCTORAL

JAIME LARRAGA CRIADO

Licenciado en Farmacia

Directores:

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Pedro José Alcolea Alcolea

Tutor:

Dr. José María Requena Rolanía

Tesis realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas en el Laboratorio de  
Parasitología Molecular

Madrid, 2019



D. Vicente Larraga Rodríguez de Vera, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y D. Pedro José Alcolea Alcolea, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Complutense de Madrid,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización de la proteína conjugadora de ubiquitina Ubc1 de *Leishmania infantum* en promastigotes *wild type* y *knock-in*” presentada por D. Jaime Larraga Criado, Licenciado en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU, ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con lo expuesto, firman este certificado, autorizando a su presentación y defensa, a tres de junio de 2019.

***A mis padres***

***A mis tíos***



***A mis abuelas***

***"Si quieres ir rápido camina solo,***

***si quieres llegar lejos ve acompañado"***

## Agradecimientos

En primer lugar, quería agradecer a la persona que me ha dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y que me ha guiado en todo el proceso de desarrollo, que además de mi director de tesis, es mi padre, Vicente Larraga, sin duda uno de los pilares mas importantes en mi carrera y mas aún en mi vida personal. Ya hace casi 5 años, cuando me llevó al laboratorio para aprender técnicas básicas de laboratorio, no podía imaginar que acabaría dando el salto a desarrollar dicha tesis doctoral. También tengo que agradecer toda la ayuda de Pedro y Ana, que sin ellos, sin duda, esta tesis no hubiera sido posible. Ana, aunque no figures como directora oficial, sabes que has sido la dirección y la organización de todo este trabajo.

Muchas han sido las personas que me han ayudado durante todo estos años en esta gran casa que considero el CIB. A Maite y Gema por las innumerables horas que me he pasado en el servicio de Microscopía y que me enseñaron a manejar los diferentes microscopios. A Paco y a Vivian por su ayuda en el servicio de Proteómica. A todos los chicos del servicio de Animalario que sin ellos gran parte de la tesis no se hubiera podido realizar y su excelente manejo de los animales. Y no olvidar a los servicios de Esterilización y Medios que sin ellos, el CIB no funcionaria.

Agradezco la oportunidad que me dio la Dra. Eugenia Puentes de CZ Vaccines, por permitirme una breve estancia en su laboratorio y darme una visión mas amplia del mundo de la industria farmacéutica, y ver como toda aquella investigación básica que se pone a punto en laboratorios como el nuestro, es continuada en la industria y llega a término en instalaciones como las suyas.

Sin duda, dentro de esta familia que considero el CIB, me quedo con todos los compañeros que he tenido y los ratos que hemos pasado dentro del laboratorio, María, Miguel, Anita, Silvia, Natalia, Alicia, Marta, Paco y Dani. A mi compañero de fatigas durante los últimos años, Luis, porque ambos hemos sufrido a la vez la tesis y lo duro que puede llegar a ser.

No puedo olvidar a mi grupo de amigos del master que nos ha hecho inseparables y que me han apoyado durante todo este largo proceso, Juan, compañero de fatigas de laboratorio y carreras, a Bea, por su eterna paciencia y que siempre está ahí para escuchar, a David por nuestras largas conversaciones arreglando el mundo, a Dani por sus locuras que te hace olvidar un rato la ciencia, y a Kiko y Tamara, que aunque no fueron del master, son de la familia.

A mi amigo Felipe porque siempre está ahí para hablar y sacar un hueco para irnos a correr y así desconectar. Aquellas interminables horas en la biblioteca del CIB estudiando la

oposición y quien diría que yo acabaría en el centro para realizar mi tesis doctoral. Aunque seguimos caminos diferentes, siempre tenemos un hueco para vernos y ordenar nuestras cabezas.

Tampoco puedo olvidar a mi entrenador y amigo, Fernando, que me ha enseñado lo mucho que se puede parecer entrenar para un Ironman y la tesis, un trabajo constante y duro, con muchos días buenos y algunos malos, pero que siempre te tienes que levantar y seguir, y que la meta es la mejor de las recompensas. Y a mis compañeros de kilómetros, Alfonso, Pedro y Miguel, que bien saben lo duro que es esto y siempre es mejor ir rodeado de amigos que entiendan tu locura.

Han sido años de arduo trabajo, con muchos momentos buenos y malos, y que al final todo tiene su recompensa. Parece mentira cuando te dicen “al final todo sale, solo tienes que continuar”.

Muchas gracias a todos

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XI</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LEISMANIASIS.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1.2. El vector de la leishmaniasis .....	5
1.1.3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	6
1.1.4. Epidemiología .....	7
1.1.4.1. Leishmaniasis humana .....	7
1.1.4.2. Leishmaniasis canina.....	9
<b>1.1.5. Manifestaciones clínicas .....</b>	<b>10</b>
1.1.5.1. Leishmaniasis humana .....	10
1.1.5.2. Clínica de la leishmaniasis canina .....	11
<b>1.1.6. Diagnóstico de la leishmaniasis.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.7. Respuesta inmunitaria .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.8. Control de la enfermedad .....</b>	<b>13</b>
1.1.8.1. Control del vector y del reservorio .....	13
1.1.8.2. Vacunas frente a la leishmaniasis.....	14
1.1.8.3. Tratamiento.....	14
<b>1.2. PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE <i>LEISHMANIA</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1. Morfología y ultraestructura .....</b>	<b>16</b>

1.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	18
1.3. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	18
1.3.1. Estructura genómica .....	18
1.3.2. Regulación de la expresión génica en el nivel transcripcional .....	19
1.3.3. Mecanismos implicados en la regulación génica en el nivel post-traducciona	20
1.3.3.1. Traducción .....	20
1.3.3.2. Modificaciones post-transduccionales .....	21
1.4. Importancia de la degradación y modificación de proteínas en la regulación de <i>Leishmania</i> : sistema ubiquitina-proteasoma.....	22
2. OBJETIVOS .....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	33
3.1.1. Cepas bacterianas .....	33
3.1.2. Parásitos .....	33
3.1.3. Línea celular humana .....	34
3.1.4. Animales de experimentación.....	34
3.2. CULTIVOS CELULARES .....	34
3.2.1. Cultivos bacterianos.....	34
3.2.1.1. Medios de cultivo .....	34
3.2.1.2. Transformación de bacterias competentes .....	34
3.2.2. Obtención de promastigotes, amastigotes y líneas <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> ....	35
3.2.2.1. Procedimientos básicos de cultivo .....	35
3.2.2.2. Aglutinación de promastigotes con lectina de cacahuete (PNA) y selección negativa .....	36
3.2.2.3. Obtención de amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i> por infección <i>in vitro</i> de células U937 estimuladas .....	36

3.2.2.4. Generación de líneas de promastigotes <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> .....	37
<b>3.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Aislamiento de ADN plasmídico .....	38
3.3.2. Extracción de ADN genómico de <i>L. infantum</i> .....	38
3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa .....	39
3.3.4. Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible .....	39
3.3.5. Purificación de ADN .....	39
3.3.6. Clonaje en vectores de expresión.....	39
3.3.6.1. Plásmidos .....	39
3.3.6.2. Preparación de los insertos .....	40
3.3.6.3. Preparación de los vectores .....	40
3.3.6.4. Ligación .....	41
3.3.6.5. Secuenciación de ADN .....	41
<b>3.4. EXPRESIÓN EN SISTEMA HETERÓLOGO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....</b>	<b>41</b>
3.4.1. Expresión de los genes codificantes de las proteínas recombinantes.....	41
3.4.1.1. Expresión de la proteína conjugadora de la ubiquitina E2 en la cepa M15 de <i>E. coli</i> .....	41
3.4.2. Purificación de proteínas recombinantes .....	42
<b>3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>43</b>
3.5.1. Obtención de extractos proteicos totales de promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. infantum</i> .....	43
3.5.2. Obtención de extractos proteicos totales de amastigotes de <i>L. infantum</i> obtenidos por infección <i>in vitro</i> de células U937 .....	43
3.5.3. Cuantificación de proteínas.....	43

3.5.4. Estudio de los niveles de expresión de proteínas por <i>Western blot</i> .....	44
3.5.5. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	44
3.6. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE <i>L. INFANTUM</i> POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA .....	45
3.7. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE <i>L. INFANTUM</i> POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	45
3.8. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES .....	47
3.9. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS LC-MS/MS .....	47
3.9.1. Preparación de muestras para ver las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de <i>LiUbc1</i> .....	47
3.9.2. Preparación de las muestras para identificación de <i>LiUbc1</i> mediante espectrometría de masas LC-MS .....	48
3.9.3. Análisis LC-MS/MS de las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de <i>LiUbc1</i> .....	48
3.9.4. Análisis de las muestras para Identificación de <i>LiUbc1</i> mediante espectrometría de masas LC-MS .....	49
3.9.5. Análisis de datos del espectrómetro de masas para la identificación de <i>LiUbc1</i> mediante espectrometría de masas LC-MS. ....	49
3.9.6. Análisis de datos del espectrómetro de masas de las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobre-expresión inducida de <i>LiUbc1</i> ..	50
3.10. ESTUDIO DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA PROTEÍNA <i>LiUbc1</i> FRENTE A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>L. INFANTUM</i> .....	50
3.10.1. Diseño experimental .....	50
3.10.2. Evaluación de la presencia del parásito en hígado y bazo .....	51
3.10.3. Evaluación de la presencia de IgG en hígado y bazo .....	51
3.11. Análisis bioinformático .....	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53



4.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA CONJUGADORA DE UBIQUITINA E2 (LiUbc1).....	55
4.2. MODELADO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA LiUbc1.....	59
4.3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA LiUbc1 RECOMBINANTE Y GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL .....	62
4.3.1. Clonaje del gen LinJ.33.2910 de <i>L. Infantum</i> . ....	62
4.3.2. Expresión en sistema heterólogo, purificación de la proteína LiUbc1 en condiciones desnaturalizantes y generación de un anticuerpo policlonal .....	63
4.3.3. Identificación de LiUbc1 mediante espectrometría de masas LC-MS. ....	66
4.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LIUBC1 DURANTE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE PROMASTIGOTES DE LOS AISLADOS MCAN/ES/MON1/Z001 Y IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE <i>L. INFANTUM</i> EN CULTIVO AXÉNICO.....	67
4.5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LIUBC1 EN PROMASTIGOTES DE LOS AISLADOS MCAN/ES/MON1/Z001 Y IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE <i>L. INFANTUM</i> EN CULTIVO AXÉNICO. ....	70
4.5.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	70
4.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	71
4.6. CARACTERIZACIÓN DE LIUBC1 EN PROMASTIGOTES AXÉNICOS DEL AISLADO IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE <i>L. INFANTUM</i> MEDIANTE LÍNEAS KNOCK-IN.....	73
4.6.1. Cinética de crecimiento .....	73
4.6.2. Niveles de LiUbc1 en promastigotes <i>knock-in</i> .....	74
4.6.3. Alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de <i>LiUbc1</i> . ....	76
4.6.4. Localización subcelular de LiUbc1 en promastigotes <i>knock-in</i> pIRmcs3-LiUbc1 del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 de <i>L. Infantum</i> en cultivo axénico.....	77
4.6.5. Evaluación de la infectividad de los promastigotes <i>knock-in</i> pIRmcs3-LiUbc1 en la línea celular mieloide humana U937 .....	77

4.7. EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i> <i>INFANTUM</i> DE HAMSTERS VACUNADOS CON LA PROTEÍNA LIUBC1. ....	79
5. DISCUSIÓN GLOBAL .....	83
6. CONCLUSIONES.....	91
7. BIBLIOGRAFÍA .....	95

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CHAPS	1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio
GAPDHg	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa glicosomal
CL	Leishmaniasis cutánea
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCL	Leishmaniasis cutánea difusa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
HIFBS	Suero bovino fetal Inactivado por calor
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilodalton
kpb	Kilo pares de bases
LACK	Análogo del receptor de la proteína C activada
LB	Medio Luria-Bertani

LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LiUbc1	Proteína conjugadora de ubiquitina E2 de <i>Leishmania infantum</i>
LPG	Lipofosfoglicano
MCL	Leishmaniasis mucocutánea
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Espectrometría de masas
Mw	Peso molecular
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Ni-NTA	Matriz de ácido nitrilotriacético-níquel
NO	Óxido nítrico
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoelectrico
PKDL	Leishmaniasis dérmica post-Kala-azar
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PNA	Aglutinina de cacahuete
PNA-	Subpoblación de promastigotes no aglutinantes con PNA
PNA+	Subpoblación de promastigotes aglutinantes con PNA
RE	Retículo endoplasmático
RFLP	Polimorfismos en los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SBF	Suero bovino fetal
SD	Desviación estándar

SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tris-acetato EDTA
Ubc1	Proteína conjugadora de ubiquitina E2
VL	Leishmaniasis visceral

## RESUMEN

*Leishmania infantum* es un protozoo parásito causante de leishmaniasis en la cuenca norte Mediterránea. Presenta un ciclo biológico complejo con una fase extracelular en el aparato digestivo del insecto vector y una fase intracelular dentro del hospedador mamífero. La expresión génica a lo largo de la fase extracelular presenta variaciones que parece que van dirigidas a preparar al parásito para resistir la actividad del sistema inmune del huésped en lo que se ha llamado teoría de la pre-adaptación. En esta fase previa a la infección, el gen correspondiente a la proteína conjugadora de ubiquitina E2 (LinJ.33.2910), está sobre-expresado. Dada la importancia de la funcionalidad de esta proteína (LiUbc1) a lo largo de la escala evolutiva, resulta de interés la caracterización de esta proteína en un eucariota primitivo como es *L. infantum*. Se ha procedido a comparar dicha proteína con sus proteínas homólogas en otros protozoos de la misma familia y de otros eucariotas inferiores y superiores. Se ha visto que la homología se mantiene dentro del género, disminuye en la misma familia y desciende respecto a las de otros eucariotas superiores. El modelado de la proteína sugiere que se trata de un homodímero similar al de la estructura de *Saccharomyces cerevisiae* y muestra una homología parcial con la de *Homo sapiens*. Se ha procedido al clonaje del gen y a la expresión del mismo, purificando la proteína recombinante. Se ha estudiado su expresión en dos aislados distintos del parásito y se han detectado diferencias entre los mismos. Se ha confirmado la existencia de una forma dimérica y otra monomérica como predecían los modelos moleculares. Se han obtenido promastigotes *knock-in* que la sobre-expresan la proteína LiUbc1 y se ha estudiado su capacidad infectiva *in vitro*. Se ha detectado que la sobre-expresión favorece la supervivencia de la fase amastigote en las primeras 24h de la infección. Esto sugiere que la proteína LiUbc1 puede estar relacionada con la capacidad infectiva del parásito. Se ha estudiado la localización de la proteína LiUbc1 en ambos aislados y además en los promastigotes *knock-in*. Se ha visto que tiene una localización en estructuras subcelulares (membrana nuclear, kinetoplasto y bolsillo flagelar). Estas estructuras concuerdan con la función de regulación asignada a la proteína. En un experimento de reto frente a la infección en el modelo de *Mesocricetus auratus* se ha mostrado que la inoculación de la proteína LiUbc1 induce protección en los animales frente a los controles no vacunados. Estos experimentos confirman que la proteína LiUbc1 puede ser un candidato vacunal.

## SUMMARY

*Leishmania infantum* is a protozoan parasite that causes leishmaniasis in the northern Mediterranean basin. It presents a complex biological cycle with an extracellular phase in the digestive tract of the insect vector and an intracellular phase within the mammalian host. Gene expression throughout the extracellular phase presents variations that seem to be aimed at preparing the parasite to resist the activity of the host immune system in what has been called pre-adaptation theory. In this pre-infection phase, the gene corresponding to the ubiquitin conjugate protein E2 (LinJ.33.2910) is over-expressed. Given the importance of the functionality of this protein (LiUbc1) along the evolutionary scale, the characterization of this protein in a primitive eukaryotic such as *L. infantum* is of interest. We have compared this protein with its homologous proteins in other protozoa of the same family and of other lower and higher eukaryotes. It has been seen that homology remains within the genus, decreases in the same family and falls with respect to those of other higher eukaryotes. Molecular modeling of the protein suggests that it is a homodimer similar to that of the structure of *Saccharomyces cerevisiae* and shows partial homology with that of *Homo sapiens*. We have proceeded to the cloning of the gene and its expression, purifying the recombinant protein. Its expression has been studied in two different isolates of the parasite and differences between them have been detected. The existence of a dimeric and a monomeric form has been confirmed as predicted by molecular models. *Knock-in* promastigotes have been obtained that over-express the LiUbc1 protein and its infective capacity has been studied *in vitro*. It has been detected that over-expression favors the survival of the amastigote phase in the first 24h of the infection *in vitro*. This suggests that the LiUbc1 protein may be related to the infective capacity of the parasite. The location of the LiUbc1 protein has been studied in wild type and *knock-in* promastigotes. It has been found to have a location in subcellular structures (nuclear membrane, kinetoplast and flagellar pocket). These structures match the regulatory function assigned to the protein. A challenge experiment against infection in the *Mesocricetus auratus* model has shown that inoculation of the LiUbc1 protein induces protection in animals against unvaccinated controls. These experiments confirm that the LiUbc1 protein could be a vaccine candidate.

## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una parasitosis vectorial causada por protozoos del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae). Se distribuye en 98 países localizados principalmente en regiones tropicales y subtropicales, dependiendo de la presencia de los vectores y el nivel de desarrollo del país, ya que es una enfermedad estrechamente vinculada a la pobreza (OMS 2010). La transmisión de la leishmaniasis puede ser zoonótica o antroponótica, y se lleva a cabo por la picadura de un insecto hematófago perteneciente al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Killick-Kendrick 1990, Killick-Kendrick 1999, Ready 2013). Más de 20 especies de *Leishmania* son patógenas para el hombre y se transmite por al menos 30 especies de flebotomos. La clínica de la enfermedad depende de la respuesta inmunitaria del hospedador y la especie parasitaria causante de la infección. Según las manifestaciones clínicas, la enfermedad puede ser clasificada como leishmaniasis cutánea (LC), caracterizada por la presencia de lesiones ulcerativas únicas en el área de inoculación del parásito; leishmaniasis mucocutánea (LMC), debido a la diseminación del agente infeccioso a la mucosa naso-orofaríngea; y leishmaniasis visceral (LV), caracterizada por su presentación sistémica y la aparición de hepatomegalia y esplenomegalia, siendo potencialmente mortal sin tratamiento (Herwaldt 1999). En la cuenca mediterránea, la LV es una zoonosis causada por *L. infantum*, donde el perro es el reservorio principal.

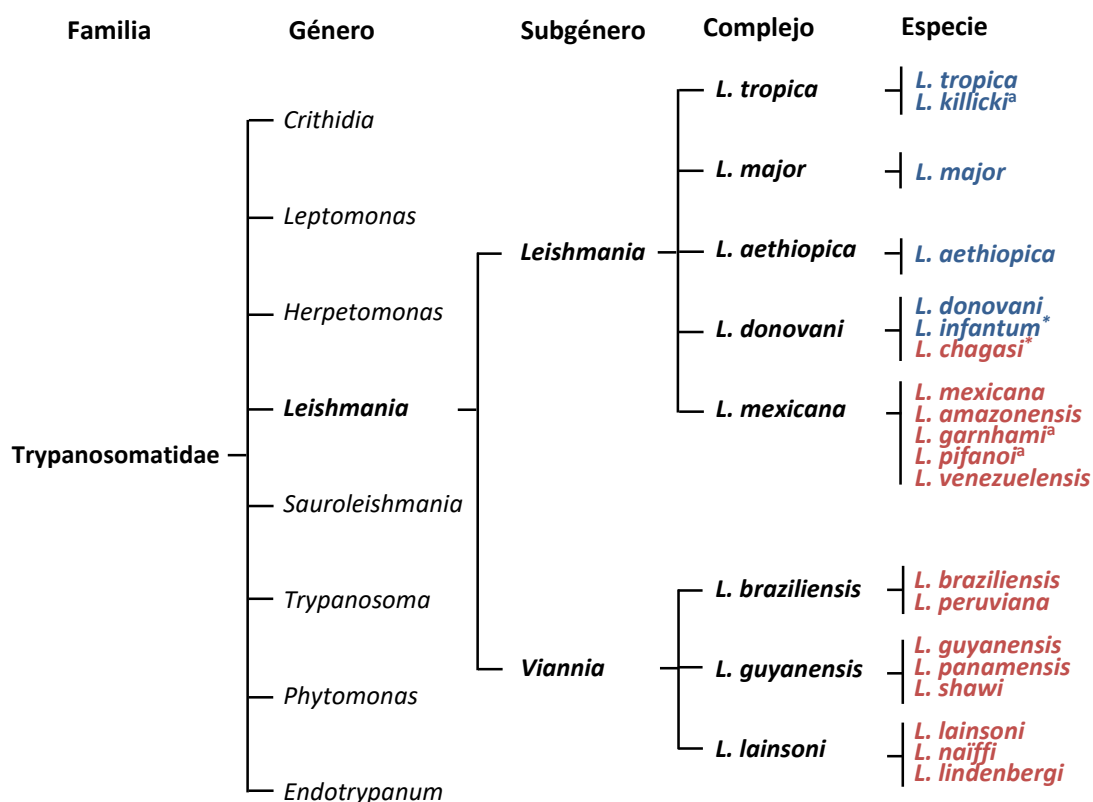
#### 1.1.1 Clasificación taxonómica del género *Leishmania*.

Los protozoos del género *Leishmania* (Cunningham, 1885) son los agentes etiológicos de la leishmaniasis. Estos parásitos fueron descritos en 1900 por Leishman y en 1903 por Donovan (Handman 1999). Su clasificación taxonómica se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania* (Cavalier-Smith 1998)**

<b>Dominio</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Protista
<b>Subreino</b>	Protozoa
<b>Filo</b>	Euglenozoa
<b>Subfilo</b>	Sacostoma
<b>Clase</b>	Kinetoplastea
<b>Orden</b>	Trypanosomatida
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae
<b>Género</b>	<i>Leishmania</i>

Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* están presentes en el Nuevo Mundo y en el Viejo Mundo, y son suprapilóricas, es decir, se desarrollan ascendiendo desde el tubo digestivo medio. Por su parte, las del subgénero *Viannia* están restringidas al Nuevo Mundo y se desarrollan desde la región peripilórica, es decir, desde el tubo digestivo posterior. Algunos autores agrupan las especies de *Leishmania* en diferentes complejos (Lainson and Shaw 1987). La LV está causada por 3 especies que se incluyen dentro del complejo *L. donovani*: *L. infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi*. En la Figura 1 se muestra un esquema de la taxonomía actualizada del género *Leishmania* (Rioux J. 1990, OMS 2010).



**Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania* y principales especies patógenas para el hombre.** Se resaltan las especies de acuerdo a su distribución geográfica: Viejo Mundo (azul) y Nuevo Mundo (rojo). *L. infantum* en el Viejo Mundo es sinónimo de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. <sup>a</sup> Estatus de especie en debate.

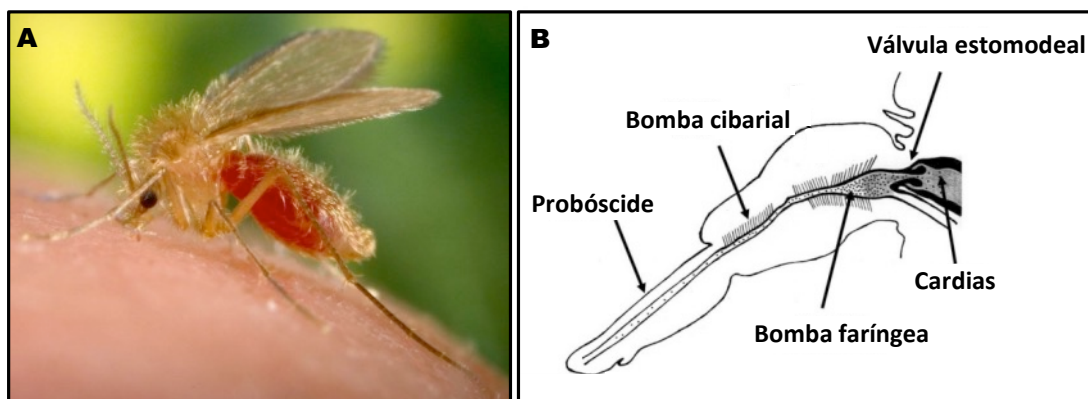
Inicialmente, las especies se clasificaron de según las manifestaciones clínicas que producen, y sus características geográficas y biológicas. Desde 1970, se han desarrollado métodos de caracterización intrínsecos, como análisis inmunológicos, bioquímicos y genómicos basados en RFLP, PCR, hibridación con sondas de ADN, etc. (Bañuls, Hide et al. 2007). El análisis isoenzimático es la técnica convencional de referencia desde el punto de vista taxonómico (Rioux J. 1990). Los parásitos de una especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos pertenecen a un único zimodema. *L. infantum* es la principal especie establecida en Europa,

donde el perro es el reservorio principal. En los estudios de caracterización de cepas se han identificado 31 zimodemas de *L. infantum* en la cuenca mediterránea, siendo el zimodema MON-1 el responsable del 90% de los casos de LV y el 20% de LC en el hombre (Alvar 2001, OMS 2010).

### 1.1.2 El vector de la leishmaniasis.

Los vectores que transmiten la leishmaniasis son dípteros que pertenecen a la subfamilia Phlebotominae. La transmisión del parásito se produce por la picadura de flebotomos hembra pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. El ciclo vital de los flebotomos consta de cuatro fases (huevo, 4 estadios larvarios, pupa y adulto. Su ciclo vital se puede desarrollar durante todo el año en las áreas tropicales, y entre los meses de mayo a octubre en regiones subtropicales (revisado por Alvar 2001). Los flebotomos se alimentan fundamentalmente de fuentes naturales de azúcares procedentes de plantas, y únicamente las hembras son hematófagas, con el fin de obtener nutrientes para la producción de los huevos (Killick-Kendrick 1999).

Las formas adultas son pardo-amarillentas y su longitud aproximada es 2-3 mm (Molyneux and Ashford 1983). Su aspecto es giboso, y poseen alas lanceoladas, patas muy largas y cuerpo recubierto por vellosidades (Figura 2). Su vuelo es silente (Killick-Kendrick, Wilkes et al. 1986), y el área de vuelo es generalmente corta y próxima a las zonas de cría (Killick-Kendrick 1990).



**Figura 2. Características morfológicas del flebotomo.** (A) Flebotomo adulto hembra durante la ingesta de sangre. Imagen tomada por J. Gathany. (B) Esquema del tubo digestivo anterior (adaptado de Bates, 2007).

Los flebotomos se distribuyen en las regiones áridas o semiáridas del Viejo Mundo y en hábitats selváticos del Nuevo Mundo (Sharma and Singh 2008). En general, su actividad es crepuscular o nocturna (Killick-Kendrick 1999, Sharma and Singh 2008) y reposan cerca de los

lugares de cría, siendo áreas frías, húmedas y oscuras (Killick-Kendrick 1999). En la cuenca mediterránea, *P. ariasi* y *P. perniciosus*, son los principales vectores responsables de la transmisión de *L. infantum* y sus densidades poblacionales son máximas durante los meses de julio y septiembre (revisado en Alvar 2001).

### **1.1.3 Ciclo biológico de *Leishmania*.**

*Leishmania* desarrolla un ciclo biológico digenético y dimórfico. Por un lado, el estadio extracelular es móvil, ya que presenta un flagelo funcional emergente del cuerpo celular, se denomina promastigote y se desarrolla en el interior del tubo digestivo del flebotomo. Por otro lado, el amastigote se multiplica en células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador mamífero y es inmóvil, ya que el flagelo no emerge del cuerpo celular. Cuando un flebotomo se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado, los amastigotes liberados de los macrófagos durante la digestión se transforman en 24-48h en promastigotes procíclicos y cuya división celular comienza rápidamente. Conforme se produce la migración ascendente hacia la válvula estomodeal (5-10 días), situada en la parte anterior del tubo digestivo medio torácico, la diferenciación de los promastigotes evoluciona a través de una serie de etapas descritas desde un punto de vista morfológico (Gossage, Rogers et al. 2003). La metaciclogénesis es el proceso de diferenciación que conduce a una forma altamente infectiva sin capacidad replicativa denominada promastigote metacíclico (Sacks y Perkins, 1984). Cuando el flebotomo se alimenta de un hospedador mamífero, inocula los promastigotes en las vénulas de la dermis. Algunos promastigotes que sobreviven a la respuesta del sistema inmune innata, son internalizados por los fagocitos y se diferencian a amastigotes en los fagolisosomas, donde proliferan (Chang and Dwyer 1976). Cuando las células hospedadoras colapsan, los amastigotes quedan liberados y pueden infectar a otras. Asimismo, los amastigotes libres y los macrófagos infectados pueden ser ingeridos nuevamente por otro insecto vector, con lo que se cierra el ciclo. Otras vías de transmisión no vectoriales muy poco frecuentes son: venérea (Symmers 1960, Silva, Oliveira et al. 2009), congénita (Figueiró-Filho, Duarte et al. 2004, Boggiatto, Gibson-Corley et al. 2011), por transfusiones sanguíneas (de Freitas, Melo et al. 2006, Dey and Singh 2006) y de forma excepcional, por el uso compartido de agujas en drogodependientes (Cruz, Morales et al. 2002).

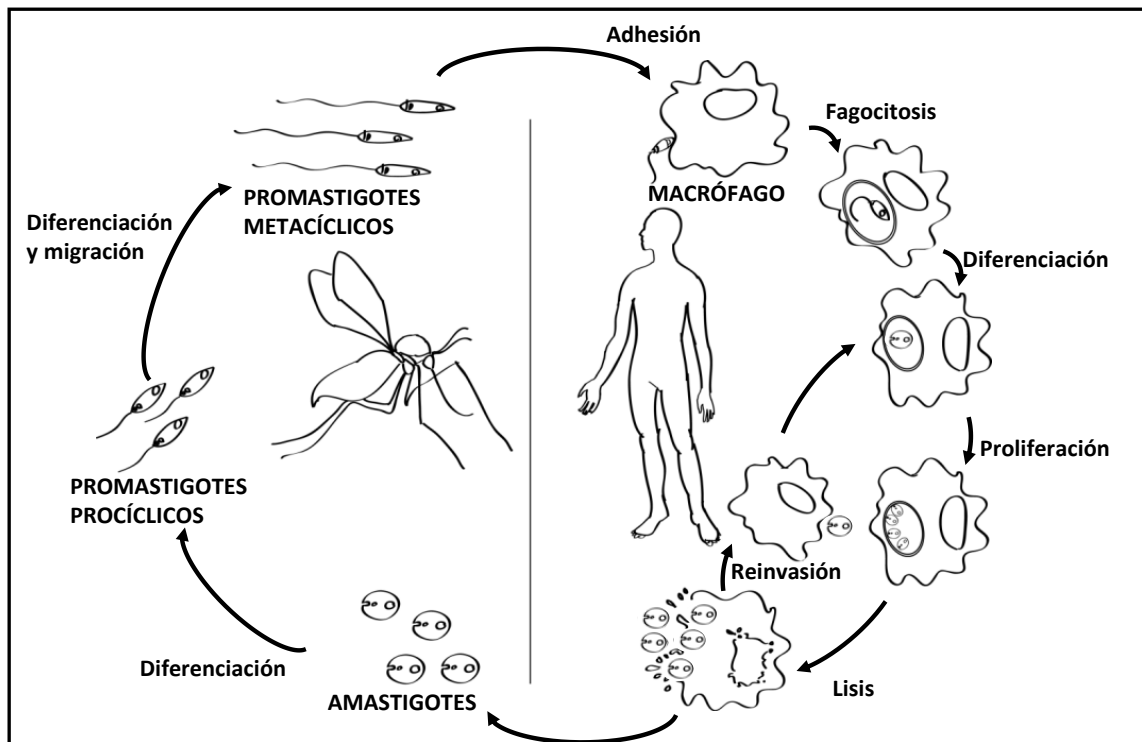


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania*. Adaptado de Handman, 1999.

#### 1.1.4 Epidemiología

##### 1.1.4.1 Leishmaniasis humana

De las aproximadamente 30 especies del género *Leishmania* que se han descrito, más de 20 son patógenas para el hombre. La leishmaniasis es endémica en 98 países y tiene una incidencia mundial anual de 1,3 millones de nuevos casos, de los cuales 300.000 son de LV, en su mayoría (90%) concentrados en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán y Sudán del Sur (WHO annual report 2016). La mortalidad anual de la LV oscila entre los 20.000 y los 50.000 casos, LV y se estima que la población en riesgo es de 310 millones de personas. Diversos factores como las migraciones, la pobreza, el cambio climático y la susceptibilidad genética del hospedador determinada por la variabilidad genética y las condiciones ambientales han contribuido a la expansión del área de distribución geográfica de la leishmaniasis desde 1993 (Figura 4). (Desjeux 2001, Aagaard-Hansen, Nombela et al. 2010). El paulatino aumento del número global de casos de LV se debe a factores, como el escaso control en las áreas de transmisión activa, la aparición de resistencias frente a los fármacos habituales, la deforestación y la proximidad y abundancia de reservorios en el ambiente doméstico.

Los cánidos son reservorios de *L. infantum* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) y de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo (América del Sur y Central). Se han registrado casos de coinfección de VIH con especies causantes de LV en 35 países. Las cifras han aumentado notablemente en zonas con difícil acceso a terapia anti-retroviral (Alvar, Aparicio et al. 2008).

En España, la leishmaniasis es una enfermedad endémica, presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares, pero no en Canarias. En julio de 2009 se detectó en el municipio de Fuenlabrada (Comunidad de Madrid) el mayor brote de leishmaniasis registrado en Europa. De hecho, se registraron 446 casos hasta diciembre de 2012 (Jiménez, Gonzalez et al. 2013). Los estudios entomológicos han propuesto que la liebre (*Lepus granatensis*) podría estar actuando como reservorio selvático (Molina, Jiménez et al. 2012), una vez comprobado que la incidencia en perros no se alteró durante ese periodo (Arce, Estirado et al. 2013).

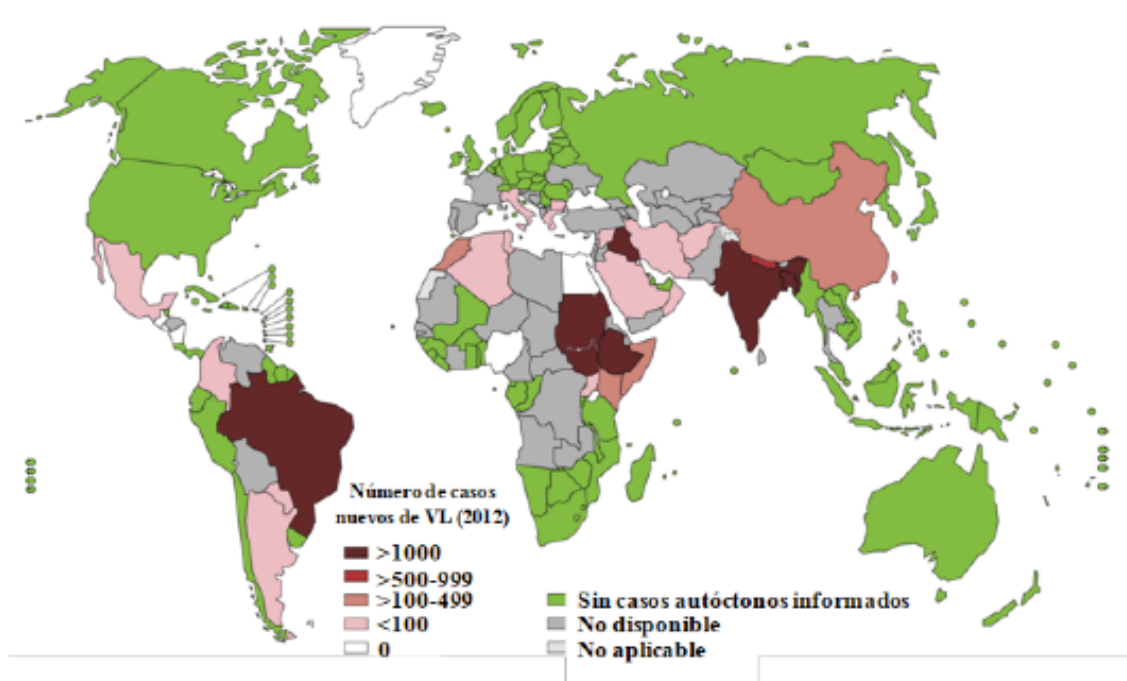


Figura 4. Incidencia anual de VL a nivel mundial (adaptado de la OMS, 2012).

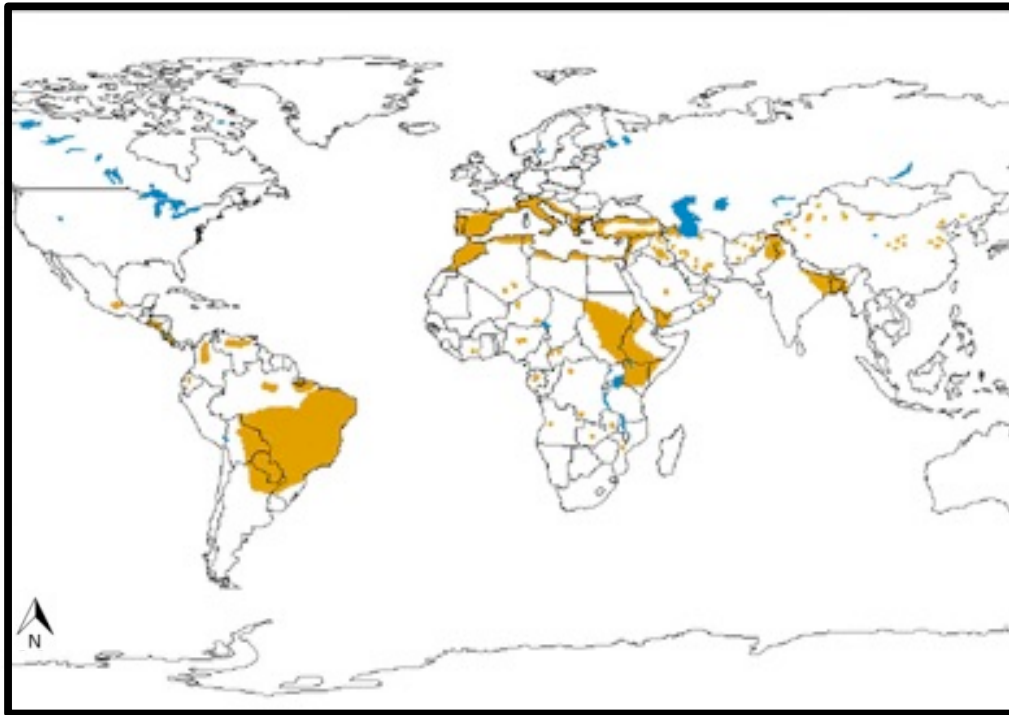


Figura 5. Prevalencia de VL a nivel mundial. Adaptado de la OMS, 2010.

#### 1.1.4.2 Leishmaniasis canina

La leishmaniasis canina (LC) es una zoonosis causada por *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. La identidad genética entre las dos especies sugiere que esta enfermedad fue importada al continente americano por perros infectados durante el periodo colonial, siendo consideradas por tanto especies sinónimas (Lukes, Mauricio et al. 2007).

La LC es endémica en más de 70 países en los que está presente la leishmaniasis humana, representando la cuenca mediterránea y Brasil los principales territorios afectados (Baneth, Koutinas et al. 2008, OMS 2010, Solano-Gallego, Miro et al. 2011). El número total de perros domésticos infectados por *L. infantum* a nivel mundial es desconocido (Gradoni 2015). En el suroeste de Europa, se estima que al menos 2,5 millones de perros están infectados (Moreno and Alvar 2002). La prevalencia de la leishmaniasis canina en este área presenta una gran variabilidad debido a la distribución focal de la enfermedad (Pennisi 2015), siendo detectada una seroprevalencia media del 10% (Franco, Davies et al. 2011). Factores socioeconómicos y posibles factores climáticos han motivado cambios en los patrones de distribución de la LC en Europa. Aunque la LC es considerada una enfermedad rural, su presencia está aumentando en zonas urbanas debido al número creciente de viviendas unifamiliares con jardín en la periferia de las ciudades y a los perros vagabundos que provienen de las zonas rurales (Tselentis, Gikas et al. 1994, Cortes, Afonso et al. 2007).

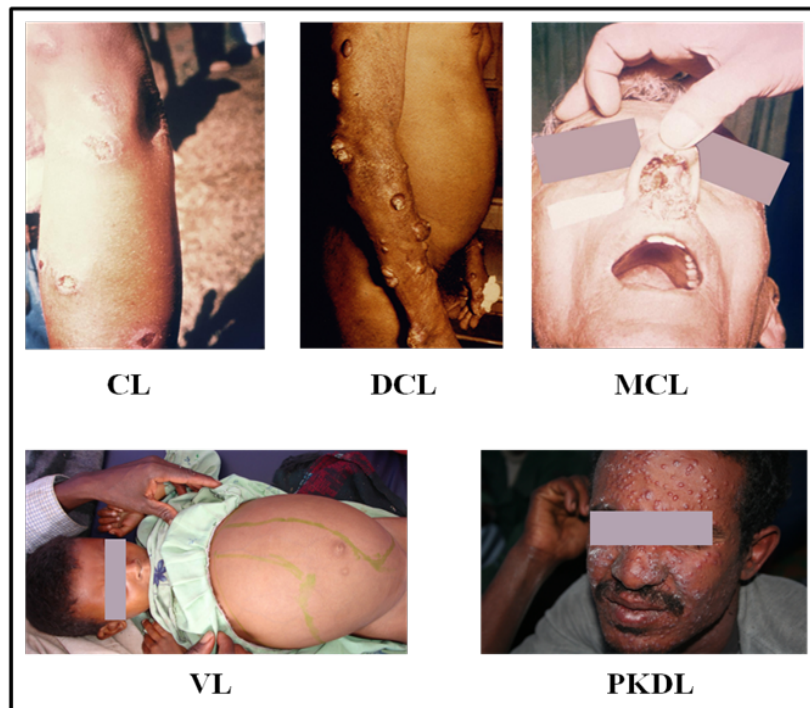
### 1.1.5 Manifestaciones clínicas.

#### 1.1.5.1 Leishmaniasis humana.

La leishmaniasis humana presenta un cuadro clínico variable según la especie del parásito, los órganos afectados y las características genéticas individuales del hospedador (Figura 6), según lo cual, se clasifica en tres grandes grupos:

- Leishmaniasis cutánea (CL): generalmente aparecen pápulas eritematosas en el lugar de la picadura que se ulceran y tienden a curar espontáneamente. En algunos casos, persisten como nódulos o placas. Las especies causantes de esta forma clínica en el Viejo Mundo son *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, y con menor frecuencia, *L. infantum* y *L. donovani* (Rioux and Lanotte 1990). En el Nuevo Mundo está causada por las especies del subgénero *Viannia* y algunas del subgénero *Leishmania*, las pertenecientes al complejo *L. mexicana*, y por otro lado *L. chagasi*. En ocasiones, la CL evoluciona en forma difusa (DCL), apareciendo lesiones no ulcerosas y diseminadas en la piel. Esta forma es crónica y presenta frecuentes recidivas. Está causada por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y por las especies del complejo *L. mexicana* en el Nuevo Mundo (Convit, Pinardi et al. 1972).
- Leishmaniasis mucocutánea (MCL): en primer lugar, aparecen úlceras cutáneas. A continuación, los parásitos se diseminan desde la piel a la mucosa nasofaríngea por vía linfática o hematógena, provocando su destrucción. La MCL está causada por las especies del subgénero *Vianna* en el Nuevo Mundo (David and Craft 2009).
- Leishmaniasis visceral (VL): también conocida como *Kala-azar*, es la forma más grave de la enfermedad. Sin tratamiento es mortal en la mayoría de los casos. Está causada por especies del complejo *L. donovani* (*L. infantum* y *L. donovani*). Presenta una amplia variedad de síntomas clínicos incluyendo fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y pancitopenia asociada con hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia (Herwaldt 1999). La leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar* (PKDL): es una complicación de la VL producida tras su remisión y causada por *L. donovani*. Se producen lesiones maculares, maculopapulares y nodulares, que se inician normalmente alrededor de la boca (David and Craft 2009).

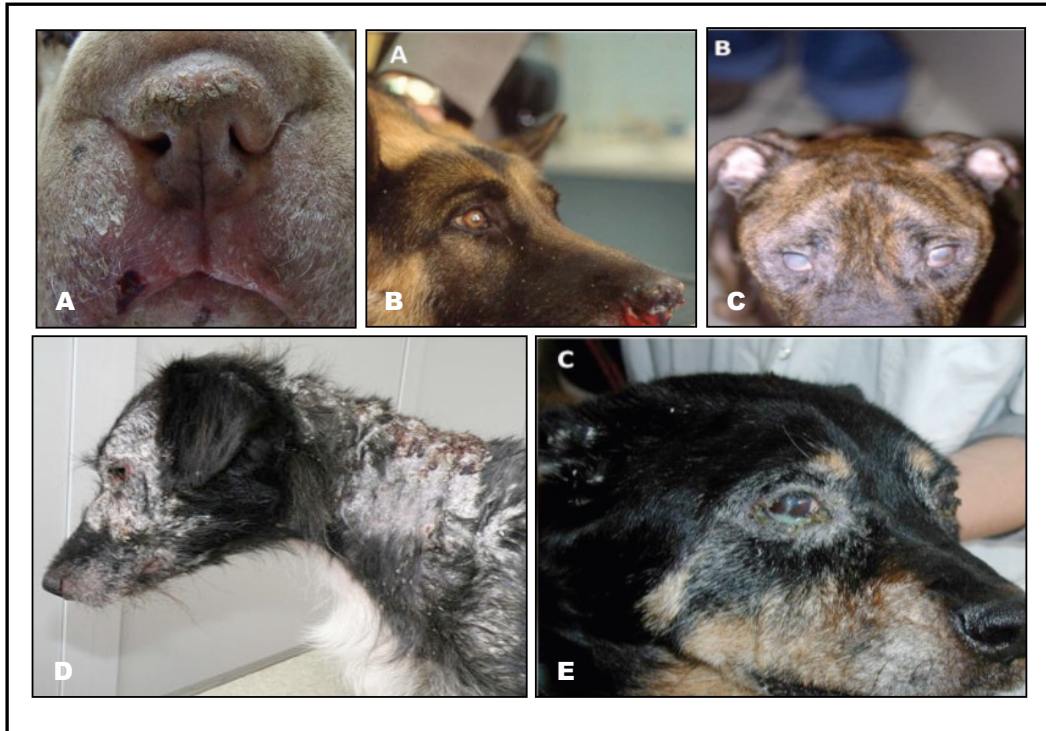




**Figura 6. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana.** CL, leishmaniasis cutánea; DCL, leishmaniasis cutánea difusa; MCL, leishmaniasis mucocutánea; VL, leishmaniasis visceral o *Kala-azar*; PKDL, leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar*. Fotografías obtenidas de las Bibliotecas de Imágenes de Salud Pública (PHIL) (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Georgia, Estados Unidos) y de la OMS (Ginebra, Suiza).

#### 1.1.5.2 Clínica de la leishmaniasis canina.

En el perro, la leishmaniasis canina cursa con signos clínicos cutáneos y viscerales (Ferrer 1989). El periodo de incubación oscila entre dos meses y varios años. En la etapa temprana aparecen signos inespecíficos, como apatía, astenia, pérdida de peso y conjuntivitis. Durante el periodo de patencia, pueden aparecer lesiones cutáneas, onicogriposis, alopecia, anorexia, fiebre, linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez de las mucosas y atrofia muscular (Figura 4). En la fase final de la enfermedad se produce caquexia, y el animal muere normalmente por fallo hepático o renal.



**Figura 7. Algunas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina.** (A) Hiperqueratosis nasal. (B) Epistaxis. (C) Uveítis bilateral y opacidad corneal. (D) Dermatitis exfoliativa difusa. (E) Caquexia. Imágenes de Saridomichelakis y Koutinas, 2013 (A, D); y de Solano-Gallego y col., 2011 (B, C, E).

#### 1.1.6 Diagnóstico de la leishmaniasis.

Por un lado, los métodos de diagnóstico etiológico permiten la observación microscópica directa del parásito. El diagnóstico de PKDL requiere biopsias cutáneas o aspirados de médula ósea (Osman, Oskam et al. 1998). La detección inmunológica se lleva a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta (detección de parásitos circulantes), ELISA y DAT (detección de anticuerpos circulantes). Por otro lado, los métodos moleculares más empleados son la PCR y la hibridación con sondas de ADN mediante *Dot-blot*. Para el diagnóstico de la leishmaniasis canina, se utilizan los métodos etiológicos e inmunológicos mencionadas arriba (Mancianti and Meciani 1988, Badaro, Eulalio et al. 1993) y el xenodiagnóstico indirecto utilizando colonias de flebotomos no infectados establecidas en laboratorios (Molina, Canavate et al. 1994).

#### 1.1.7 Respuesta inmunitaria.

Inmediatamente después de la inoculación de los promastigotes en la dermis del hospedador mamífero durante la alimentación del flebotomo, se activa la respuesta inmunitaria innata. Tras la opsonización por IgM, se activa la vía clásica del sistema del complemento. Los promastigotes no eliminados pueden ser internalizados por los fagocitos, dando lugar al inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los fagocitos migran hacia los órganos linfoides

secundarios, donde se produce la presentación de antígenos a las células T colaboradoras vírgenes (Walker, Oghumu et al. 2014).

En la infección de *L. major* en ratón, la respuesta T colaboradora de tipo 1 (Th1) da lugar a protección, mientras que la Th2 determina la susceptibilidad del hospedador (Gumy, Louis et al. 2004). La producción de interleuquina 12 (IL12) asociada a la respuesta Th1 induce la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> y por las células NK (Scharton-Kersten, Afonso et al. 1995), lo que induce la activación de los macrófagos para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). La respuesta Th2, se caracteriza por la producción de IL-10, IL-4 e IL-13, entre otras, dando lugar a la producción de anticuerpos y a susceptibilidad a la infección, ya que el parásito es intracelular obligado (Sacks and Noben-Trauth 2002). En la leishmaniasis humana, la respuesta inmunitaria varía en función del hospedador y del cuadro clínico. En la CL predomina la respuesta Th1, pero no existe una dicotomía clara en el tipo de linfocitos T que participan (Ajadary, Alimohammadian et al. 2000). En la VL, el aumento de IL-10 da lugar probablemente al desarrollo de la patogenicidad, (Mary, Auriault et al. 1999) (Ghalib, Piuvezam et al. 1993) mientras que la citoquina IL-12 favorece la linfoproliferación y la producción de IFN-  $\gamma$  (Bacellar, D'Oliveira et al. 2000). En la infección en perro, la respuesta Th1 predomina en perros asintomáticos y las citoquinas Th2 darían lugar al progreso de la enfermedad según algunos autores (Barbieri 2006), pero según otros, el balance entre ellas determina la protección (Alcolea, Alonso et al. 2019).

### **1.1.8 Control de la enfermedad.**

#### **1.1.8.1 Control del vector y del reservorio.**

El control del vector es una de las medidas más eficaces para controlar la leishmaniasis, utilizando piretroides como la resmetrina (Tetreault, Zayed et al. 2001), tanto en interiores (lugares de reposo, contornos de ventanas y mosquiteras) como en exteriores (perreras, porches, etc.), dada su baja toxicidad en mamíferos (Alexander and Maroli 2003). Para la eliminación de la forma larvaria, una alternativa es la introducción de flebotomos adultos infectados con la bacteria larvicida *Bacillus sphaericus* en los criaderos potenciales (Robert, Perich et al. 1997). En las leishmaniasis zoonóticas, para limitar la incidencia de la enfermedad se ha de controlar el reservorio haciendo un seguimiento del tratamiento en los perros domésticos infectados (Moreno and Alvar 2002) y controles de los perros vagabundos que, a pesar de no mostrar signos clínicos en muchas ocasiones, son frecuentemente seropositivos frente a *L. infantum* (Miro, Montoya et al. 2007).

### 1.1.8.2 Vacunas frente a la leishmaniasis.

Las vacunas de primera generación frente a *Leishmania* spp. fueron la primera forma de vacunación utilizada (Nadim, Javadian et al. 1983). Sin embargo el uso de células vivas atenuadas se ha desechado por problemas de seguridad (Handman 2001). La utilización de promastigotes autoclavados muestra una respuesta protectora al principio, pero su nivel de eficacia desciende con el tiempo (Antunes, Mayrink et al. 1986, Sharifi, FeKri et al. 1998).

Actualmente existen cuatro vacunas frente a la leishmaniasis canina aprobadas por las agencias reguladoras, dos de ellas en Europa (*Canileish*®, Virbac, Francia) (Oliva, Nieto et al. 2014) y LetiFend® (LETIPharma) (Fernandez Cotrina, Iniesta et al. 2018) y las otras dos en Brasil (*Leishmune*® y *LeishTec*®) (Otranto and Dantas-Torres 2013). Estas vacunas protegen sólo parcialmente. Sin embargo, no se dispone de vacunas frente a la leishmaniasis humana. Actualmente, se está utilizando el gen LACK (análogo de la proteína quinasa C activada) en forma de vacunas de tercera generación utilizando plásmidos como vehículos frente a *L. major* o *L. infantum* en modelo de ratón (Gonzalo, del Real et al. 2002, Pinto, Pinheiro et al. 2004, Gomes, Pinto et al. 2007) y en perros (Ramos, Alonso et al. 2008, Ramos, Alonso et al. 2009).

### 1.1.8.3 Tratamiento.

Para el tratamiento de la leishmaniasis hay que tener en cuenta varios factores (especie de parásito, forma de la enfermedad, etc.). Dado el incremento en la aparición de resistencias y recidivas, así como la toxicidad asociada a algunos de los tratamientos utilizados, se requiere la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas.

- Antimoniales pentavalentes.

Han sido el tratamiento clásico y de primera elección para cualquier tipo de leishmaniasis durante décadas, aunque actualmente su uso está más restringido debido a la aparición de cepas resistentes (Lira, Sundar et al. 1999). Los antimoniales comenzaron a utilizarse en su forma trivalente a principios del siglo XX, pero dada su toxicidad, a mediados de siglo se comenzaron a utilizar en forma pentavalente. En la actualidad hay dos formulaciones disponibles: el antimoniato de meglumina (*Glucantime*®) y el estibogluconato sódico (*Pentostam*®). Ambas son similares en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción (Chulay, Fleckenstein et al. 1988). Se administra por vía intramuscular o intravenosa. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad del antimonio trivalente de bloquear los grupos sulfhidrilo, inhibiendo la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y las enzimas tripanotona reductasa, fosfofructoquinasa y topoisomerasas. La aparición de resistencias se produce debido a la eliminación del complejo antimonio-tiol a través de transportadores de tipo ATP-asas y

exocitosis (Legare, Richard et al. 2001). Produce efectos secundarios como náuseas, vómitos, astenia, mialgia, diarreas, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad.

- Anfotericina B.

Es un antibiótico poliénico que altera la permeabilidad de las membranas celulares al interaccionar con el ergosterol, cuyas funciones en las membranas de *Leishmania* son equivalentes a las del colesterol en las membranas de mamíferos (Ramos, Valdivieso et al. 1996). Se administra por vía intravenosa como emulsión con desoxicolato sódico (*Fungizone*®) con una tasa de curación cercana al 100%. Sin embargo, tiene numerosos y graves efectos secundarios (Mishra, Singh et al. 1991). La formulación liposomal (*AmBisome*®) disminuye la toxicidad debido a que la liberación se retarda y se dirige específicamente a los órganos afectados. La elevada tasa de curación con la formulación liposomal hace que sea el tratamiento de elección para la VL en países desarrollados, pero su uso en países en desarrollo es difícil. Además, se han identificado aislados clínicos de *L. donovani* resistentes al fármaco, ya que producen esteroides modificados en lugar de ergosterol (Purkait, Kumar et al. 2012).

- Miltefosina.

Es una alquilfosfolina utilizada como fármaco antitumoral y el primer fármaco de administración oral utilizado frente a la leishmaniasis humana (*Impavido*®). La tasa de curación es de aproximadamente un 94% y su mecanismo de acción se basa en la capacidad de interferir en el metabolismo de los fosfolípidos y de inhibir la biosíntesis de glucolípidos y glucoproteínas, así como de inducir muerte celular (Lux, Heise et al. 2000, Sundar and Rai 2002). Presenta efectos secundarios importantes, pero la acumulación del fármaco en los tejidos facilita la aparición de resistencias, que se han relacionado con un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen de la proteína transportadora de miltefosina de *L. donovani* (Cojean, Houze et al. 2012).

- Paromomicina o aminosidina.

Es un aminoglucósido aislado del género *Streptomyces* que se administra por vía intramuscular u oral. Inhibe la síntesis de proteínas por su unión al ribosoma del parásito (Fernandez, Malchiodi et al. 2011). Tiene un uso limitado para el tratamiento de VL debido a la existencia de otros tratamientos. No se han descrito casos clínicos de resistencias a este antibiótico. La administración tópica de paromomicina para el tratamiento de CL está en fase de desarrollo (Ben Salah, Ben Messaoud et al. 2013).

- Pentamidina.

La pentamidina (*Lomidine*®) es una diamidina que se ha utilizado como fármaco de segunda línea para el tratamiento de la leishmaniasis durante casi 40 años. Su mecanismo de acción no

está claro, aunque se ha sugerido que es por la capacidad del compuesto de inhibir la síntesis de poliaminas y en su capacidad para alterar el potencial de la membrana mitocondrial (Bray, Barrett et al. 2003). El desarrollo de resistencias frente a la pentamidina en *Leishmania* parece estar relacionado con la sobre-expresión del gen de la proteína de resistencia a pentamidina 1 (PRP1), un transportador de la familia ABC (Coelho, Messier et al. 2007).

- Sitamaquina.

Es una 8-aminoquinoleína análoga de la primaquina, utilizada en el tratamiento de la malaria que colapsa el potencial de membrana de la mitocondria. Se encuentra en fase de ensayos clínicos. Su baja vida media favorece que no haya resistencias (Loiseau, Cojean et al. 2011).

- Alopurinol:

Se utiliza para el tratamiento de la leishmaniasis canina exclusivamente (*Zyloric*<sup>®</sup>). Es un isómero de la hipoxantina que inhibe competitivamente la xantina oxidasa, bloqueando la síntesis de purinas (Nelson, LaFon et al. 1979) y actúa como inmunomodulador. Se utiliza conjuntamente con los antimoniales pentavalentes (Martinez, Looker et al. 1988).

- Azoles:

Son antifúngicos que inhiben la enzima C14- $\alpha$ -desmetilasa, que participa en la ruta de síntesis de ergosterol en *Leishmania*. La efectividad del tratamiento es variable (Berman 1981, Rangel, Dagger et al. 1996).

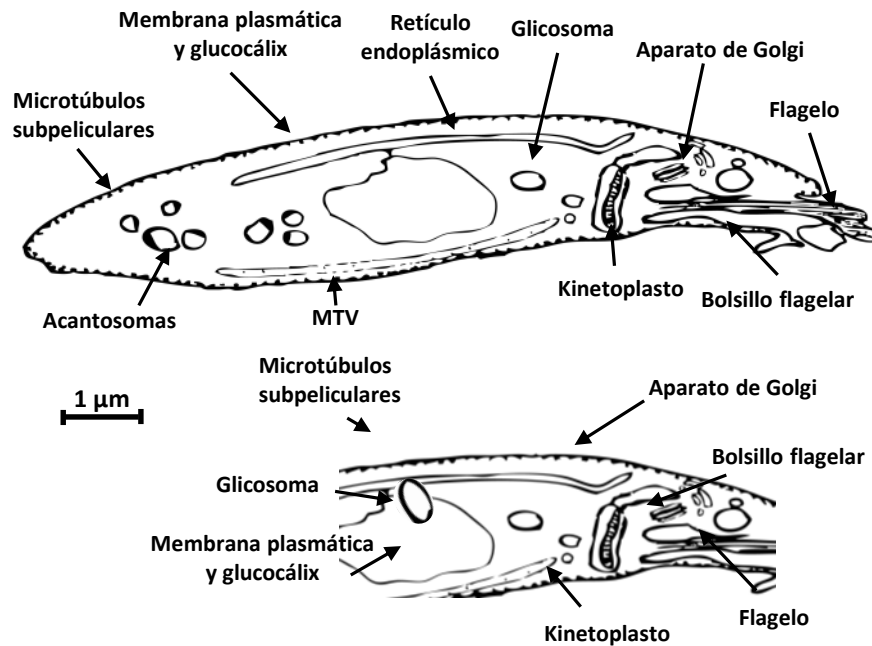
## 1.2 PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *LEISHMANIA*.

### 1.2.1 Morfología y ultraestructura.

El promastigote es fusiforme (5-20 $\mu$ m) y su flagelo emerge del cuerpo celular, mientras que el amastigote es esférico (6-8 $\mu$ m) y carece de flagelo emergente.

La zona externa de la membrana plasmática está tapizada por un glicocálix o cubierta de glicoconjugados que es fundamental para la supervivencia del parásito. Las moléculas que componen esta cubierta se anclan a la membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Entre los principales glicoconjugados de superficie se encuentran el lipofosfoglicano (LPG), el proteofosfoglicano (PPG) y la glicoproteína de superficie gp63 o leishmanolisina (Ilg 2001, Sacks and Kamhawi 2001). En la superficie de los amastigotes escasea el LPG pero hay una gran cantidad de GPI libre y de glicosfingolípidos adquiridos de la célula hospedadora (Turco and Sacks 1991, Winter, Fuchs et al. 1994). En ambos estadíos está presente el bolsillo flagelar (Figura 8), que es una invaginación de la membrana plasmática relacionada con los procesos de endocitosis y exocitosis (Gluenz, Ginger et al. 2010). La cara interna de la membrana plasmática está reforzada con haces de microtúbulos dispuestos en espiral, excepto en el bolsillo flagelar

(Hou, Pimenta et al. 1992), que confieren una morfología relativamente estable y cierto movimiento contráctil.



**Figura 8. Morfología y ultraestructura del promastigote y el amastigote de *Leishmania*.** MVT, túbulo multivesicular. Adaptado de Handman y col., 2008.

Cada célula de *Leishmania* presenta una única mitocondria que contiene el ADN mitocondrial o del kinetoplasto (ADNk). Dicho material genético se localiza próximo al cuerpo basal del flagelo y está compuesto por una red concatenada de aproximadamente 50 maxicírculos (20-40 kb) y miles de minicírculos (0,8-1,6 kb). Los maxicírculos son análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores y codifican principalmente para ARNr y diferentes subunidades de la cadena respiratoria. Por su parte, los minicírculos codifican para ARN guía (ARNg), el cual participa en un proceso de modificación del ARNm de algunos genes mitocondriales mediante la inserción o delección de uracilos (Brennicke, Marchfelder et al. 1999). Además, *Leishmania* presenta otros orgánulos específicos como el glicosoma y el megasoma. El glicosoma es un compartimento único en los tripanosomátidos que guarda semejanza con los peroxisomas. En él tienen lugar la mayor parte de las etapas del metabolismo de los glúcidos (Oppendoes and Michels 1993). El megasoma es un orgánulo lisosomal muy voluminoso que contiene entre otras enzimas, una alta proporción de cisteín-proteasa asociadas a la capacidad invasiva de los amastigotes (McKerrow, Sun et al. 1993). Los acantosomas constituyen otro tipo de vacuolas asociadas al almacenamiento, ya que contienen reservas de polifosfato, calcio, sodio, zinc y magnesio (Docampo and Moreno 1999). Además de los lisosomas convencionales, los parásitos del género *Leishmania* poseen el túbulo multivesicular (MVT), un lisosoma

relacionado con la degradación de algunas proteínas del retículo endoplásmico y que se extiende a lo largo del cuerpo celular (Mullin, Foth et al. 2001).

### 1.2.2 Cultivo *in vitro*.

Los cultivos axénicos de promastigotes reproducen razonablemente las condiciones del interior del tubo digestivo del vector, dando lugar a formas altamente infectivas o promastigotes metacíclicos (da Silva and Sacks 1987, Winter, Fuchs et al. 1994).. Sin embargo, la infectividad es menor que la de los promastigotes metacíclicos del tubo digestivo del vector (Alcolea, Alonso et al. 2016), y los sucesivos pases en cultivo atenúan la infectividad de los promastigotes. Los medios de cultivo empleados para los promastigotes son indefinidos porque contienen sangre o suero que aportan nutrientes complejos. La temperatura óptima de incubación es 26-27°C, imitando las condiciones del tracto digestivo del vector y se alcanza la fase estacionaria de cultivo aproximadamente a los 7 días. Un método para separar promastigotes metacíclicos de *L. major* y *L. infantum* es la selección negativa con la lectina de cacahuete (PNA) (Spath and Beverley 2001).

El cultivo de promastigotes a temperaturas elevadas (32-37°C según la especie) y pH ácido (5,5) induce su diferenciación a amastigotes (Bates 1993, Zilberstein and Shapira 1994, Alcolea, Alonso et al. 2010). Sin embargo, se han observado importantes diferencias en los perfiles de expresión génica (Holzer, McMaster et al. 2006, Rochette, Raymond et al. 2009, Alcolea, Alonso et al. 2010, Alcolea, Alonso et al. 2010, Alcolea, Alonso et al. 2014) que indican que los amastigotes axénicos no son equivalentes a los amastigotes intracelulares obtenidos de macrófagos mamíferos (Debrabant, Joshi et al. 2004).

## 1.3 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

### 1.3.1 Estructura genómica.

Los genomas de los tripanosomátidos son diploides. En *Leishmania*, las especies del Viejo Mundo (*L. major* y *L. infantum*) presentan 36 pares de cromosomas, mientras que las especies del Nuevo Mundo tienen 35 (*L.(V.) braziliensis*) ó 34 pares de cromosomas (*L. mexicana* y *L. amazonensis*).

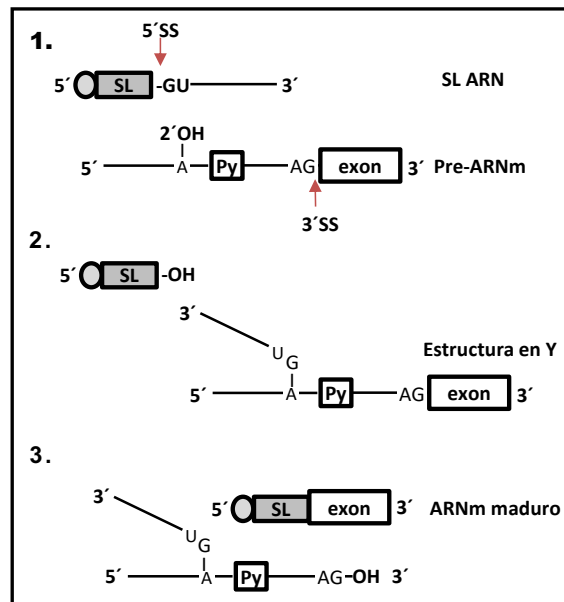
En la última década se ha llevado a cabo la secuenciación genómica de diferentes kinetoplastidos como *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. Entre las especies de *Trypanosoma* más estudiadas destacan *T. cruzi* y *T. brucei*, agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana, respectivamente. En el caso de *Leishmania*, *L. major* fue la primera especie secuenciada y ha sido empleada como referencia en estudios genómicos sobre tripanosomátidos (Ivens, Peacock et al. 2005). Aunque el genoma de las diferentes especies de



*Leishmania* ha sido secuenciado, los estudios de genómica comparativa se han centrado en el análisis de tres especies fundamentalmente: *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* (Peacock, Seeger et al. 2007) (Smith, Peacock et al. 2007). A pesar de la divergencia geográfica y evolutiva de dichas especies, se observan pequeñas variaciones a nivel de organización genómica y secuencia. Los genomas presentan un tamaño medio aproximado de 33 Mpb y se ha predicho la existencia de unos 8.300 genes codificantes de proteínas y 900 genes de ARN. Sólo el 35% de las proteínas estimadas presentan una función biológica conocida, atribuida en base a ensayos experimentales (3,7%) y análisis de secuencias (31,5%) (revisado por Myler 2008). A pesar de la divergencia entre los géneros de *Leishmania* hace 20-100 millones de años, las tres especies analizadas presentan una sintenia superior al 99%. Por tanto, esto sugiere que sólo unos pocos genes específicos de especie podrían contribuir en la patogenia y tropismo celular. El análisis comparativo de *L. major* con *T. cruzi* y *T. brucei* ha revelado la presencia de un núcleo conservado de 6.200 genes codificantes de proteínas con un elevado nivel de sintenia (El-Sayed, Myler et al. 2005). Sin embargo, aproximadamente 1.000 genes están presentes de manera exclusiva en *Leishmania*.

### **1.3.2 Regulación de la expresión génica en el nivel transcripcional.**

El proceso de transcripción en los tripanosomátidos presenta grandes diferencias respecto a la mayoría de los organismos eucariotas y se caracteriza por la presencia de unas estructuras únicas que permiten llevar a cabo una regulación de la expresión génica principalmente a nivel post-transcripcional. Los genes están organizados en largas unidades policistrónicas que son transcritas como ARNm precursor (Martinez-Calvillo, Vizuet-de-Rueda et al. 2010). El procesamiento de los transcritos policistrónicos en unidades monocistrónicas implica dos reacciones mecánicamente acopladas: el corte y empalme en *trans* o *trans-splicing* y la poliadenilación (revisado por Liang, Haritan et al. 2003). El *trans-splicing* comprende la adición de un mini-exón de ARN o *spliced leader* (SL), con un tamaño de 39 a 41 nucleótidos, en el extremo 5' del ARNm a través de una reacción de *trans*-esterificación. Esta reacción se produce en dos etapas, dando lugar a un intermediario en forma de Y, lo que difiere de la reacción de *cis-splicing*. El proceso de *trans-splicing* es dirigido por una región polipirimidínica rica en uracilos que precede al aceptor del SL, un dinucleótido AG-3' que se localiza entre 50 a 100 pb antes del sitio de inicio de la traducción. La eficiencia del *trans-splicing* depende de la longitud y composición de la región polipirimidínica así como de las secuencias presentes en las regiones no traducidas en 5' (UTR-5') (Figura 9) (revisado por Liang, Haritan et al. 2003). La señal que determina la poliadenilación en el extremo 3' se encuentra entre 100 a 300 nucleótidos anteriores a la señal de empalme en *trans* del siguiente gen.



**Figura 9. Mecanismo de *trans-splicing* descrito en tripanosomátidos.** 1. Se indican el sitio de corte GU 5' (5'SS) en el *spliced leader* (SL ARN) y el sitio de corte AG 3' (3'SS) en el ARNm precursor (Pre-ARNm). 2. Reacción de transesterificación: formación del Intermediario en Y. 3. ARNm maduro. PY, región polipirimidínica.

### 1.3.3 Mecanismos implicados en la regulación génica en el nivel post-transcripcional.

A pesar de que las unidades policistrónicas son transcritas constitutivamente, es posible encontrar distintos niveles de expresión de ARNm a lo largo del ciclo biológico de los tripanosomátidos. En ausencia de un promotor definido, la regulación de la expresión génica es llevada a cabo fundamentalmente a nivel post-transcripcional a través del procesamiento y estabilidad del transcrito, así como la eficiencia de la traducción y estabilidad de la proteína. Los elementos *in cis* presentes en las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, así como los factores de interacción *in trans* con las regiones no codificantes, desempeñan un papel esencial en estos mecanismos de control (revisado por Clayton and Shapira 2007, Keene 2007). Los elementos SIDER, derivados de retroposones extintos, han sido identificados en el genoma de diversas especies de *Leishmania* con una distribución uniforme y en relación con las regiones 3'-UTR. Ensayos experimentales han puesto de manifiesto que su presencia está asociada a un descenso en la estabilidad del transcrito. Por lo tanto, estos elementos podrían haber sido reciclados por *Leishmania* como un mecanismo de regulación de la expresión génica post-transcripcional (Bringaud, Muller et al. 2007, Requena, Folgueira et al. 2008).

#### 1.3.3.1 Traducción.

La traducción es el último paso en el flujo de la información génica, y la regulación a este nivel permite una respuesta inmediata, reversible y un ajuste preciso de la abundancia de

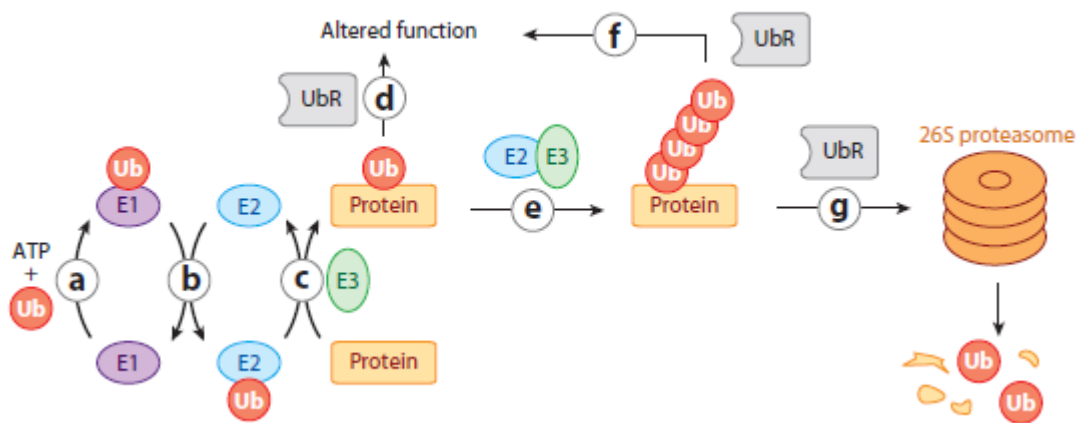
proteína. Este punto de control crítico favorece una respuesta adaptativa eficaz del parásito para hacer frente a los cambios fisiológicos y situaciones ambientales de estrés que tienen lugar durante el complejo ciclo biológico de *Leishmania* (revisado por Myler 2008). La regulación a nivel traduccional se ha descrito en algunos genes de *Leishmania*, como en el caso de las histonas (Soto, Iborra et al. 2004), proteínas de choque térmico HSP70 y HSP83 (Larreta, Soto et al. 2004, Folgueira, Quijada et al. 2005), las amastinas de superficie (McNicoll, Muller et al. 2005) y la proteína homóloga quinasa activada por el mitógeno LmxPK4 (Kuhn and Wiese 2005). Las regiones 3'-UTR representan elementos esenciales para la regulación de la expresión de las mencionadas proteínas a nivel post-transcripcional. Los estudios de expresión génica han revelado que sólo de un 0,2 a un 5% de los genes están diferencialmente expresados a nivel de ARNm entre los estadíos de amastigote y promastigote (Akopyants, Matlib et al. 2004, Cohen-Freue, Holzer et al. 2007, Alcolea, Alonso et al. 2010); por tanto, la mayoría del genoma se expresa constitutivamente (Leifso, Cohen-Freue et al. 2007). Por el contrario, los estudios proteómicos revelan que hasta un 18% de las proteínas de *Leishmania* se encuentran diferencialmente expresadas entre los distintos estadíos (Bente, Harder et al. 2003, McNicoll, Drummelsmith et al. 2006, Rosenzweig, Smith et al. 2008, Alcolea, Alonso et al. 2011). Además, los niveles de expresión de proteínas muestran una baja correlación con los niveles de ARNm (McNicoll, Drummelsmith et al. 2006, Cohen-Freue, Holzer et al. 2007). Todas estas observaciones ponen de manifiesto la importancia del control traduccional y post-traduccional en la regulación de la expresión génica en estos parásitos.

### **1.3.3.2 Modificaciones post-traduccionales.**

Las modificaciones post-traduccionales tienen un efecto directo sobre la estabilidad, la localización subcelular y la actividad de las proteínas. Aunque existen numerosos estudios sobre las variaciones cualitativas y cuantitativas de los perfiles de expresión génica en promastigotes y amastigotes, se sabe muy poco acerca del papel que desempeñan las modificaciones post-traduccionales en el proceso de diferenciación de *Leishmania* (Bente, Harder et al. 2003, McNicoll, Drummelsmith et al. 2006, Rosenzweig, Smith et al. 2008, Alcolea, Alonso et al. 2011). El avance en las estrategias de enriquecimiento de proteínas y péptidos fosforilados, así como en las técnicas de espectrometría de masas, ha supuesto un avance en el mapeo a gran escala de los sitios de fosforilación en tripanosomátidos (Marchini, Godoy et al. 2014). El primer análisis de fosfoproteómica fue llevado a cabo en promastigotes y amastigotes de *L. donovani* (Morales, Watanabe et al. 2008) detectando proteínas fosforiladas relacionadas con estrés, choque térmico, etc.

#### **1.4 Importancia de la degradación y modificación de proteínas en la regulación de *Leishmania*: sistema ubiquitina-proteasoma.**

El sistema de ubiquitina-proteasoma es una vía general de regulación post-traducciona para controlar la actividad y estabilidad de las proteínas que intervienen en gran parte de los procesos celulares esenciales, por ejemplo, la progresión del ciclo celular, la señalización, la asociación al ADN, etc. Estas modificaciones pueden ser llevadas a cabo también mediante moléculas de pequeño tamaño con moléculas ubiquitina-like (*small ubiquitin-like modifiers* o *SUMO*) que provocan la regulación de procesos esenciales como la integridad del genoma, la expresión génica o la biogénesis ribosomal. Esto se hace mediante modificaciones de la estructura que puede alterar las vidas medias enzimáticas, la capacidad para unirse a otras proteínas, etc. Las proteínas diana son ligadas con moléculas de ubiquitina a través de una cascada enzimática compuesta por la enzima E1 activadora, la E2 conjugadora y las E3 ubiquitina ligasas (Rojas, Koszela et al. 2017). Este proceso contribuye a la modificación del proteasoma a lo largo del desarrollo en líneas celulares especializadas como los reticulocitos (Nguyen, Prado et al. 2017) o al control de proteínas huérfanas, esto es, carentes de alguna de sus subunidades (Yanagitani, Juszkieicz et al. 2017). Este proceso se inicia por el enzima E1 activadora de la ubiquitina que a continuación la transfiere a un residuo activo de cisteína de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 mediante un enlace tioéster. Aunque E2 puede unirse a la ubiquitina directamente a un residuo de lisina en el sustrato, la mayor parte de las reacciones fisiológicas de ubiquitinación requieren la actuación de una ubiquitina ligasa (E3) (Deshaies and Joazeiro 2009). Una vez ubiquitinada, la proteína diana puede seguir la vía de la modificación de función o seguir ligando moléculas de ubiquitina. En este caso, una vez que el sustrato está poliubiquitinado por este enzima, es reconocido y degradado por el proteasoma 26S (véase Figura 11). No obstante, el sistema es probablemente más complejo. Así, se han descrito proteínas en reticulocitos que pueden actuar como enzimas de tipo E2 y E3 (Nguyen, Prado et al. 2017).



**Figura 11. El sistema ubiquitina-proteasoma.** (tomado de Deshaies y Joazeiro, 2009) a) La ubiquitina (Ub) y ubiquitina-like se activan por la transferencia por E1 (enzima activadora de la Ubiquitina). b) la Ubiquitina activada se transfiere en una unión de tipo tioéster de un sitio activo de una cisteína a otra cisteína de un sitio activo de E2 (el enzima conjugadora de la ubiquitina). c) El enlace tioéster E2-Ub interacciona a continuación con una ubiquitina ligasa E3 que transfiere la Ub desde la Ub-E2 a un residuo lisina de un sustrato. Este sustrato monoubiquitinilado se puede o bien disociar de E3 (d) o bien puede adquirir una molécula adicional de ubiquitina (Ub) y así sucesivamente para conformar múltiples modificaciones individuales de Ub (no mostradas) o una cadena de ubiquitinas (e). La cadena puede unirse a través de múltiples residuos de Lys de la ubiquitina. Mientras que la monoubiquitina y algunos tipos de cadenas (p.ej. aquellos unidos a través de la Lys63 de la Ubiquitina) sirven para alterar la función de la proteína ubiquitinilada (f) bien cambiando la estructura, uniendo ligandos, etc. Las cadenas poliubiquitiniladas se ensamblan a través del residuo Lys48 de ubiquitina que típicamente unen el sustrato al proteasoma 26S para su degradación (g). El resultado biológico de la ubiquitinilación, bien la degradación o la producción de una señal depende normalmente de los receptores de ubiquitina (UbR) que se unen a esta e interpretan su señal

Hay una evidencia creciente de la asociación entre una disminución del sistema ubiquitina-proteasoma y de su homeostasis con diversas enfermedades relacionadas con plegamientos erróneos de proteínas, especialmente enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo Cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson, nódulos en la enfermedad de Alzheimer) que tienden a acumular ubiquitina unida a proteínas agregadas (Dawson and Dawson 2003, Upadhy and Hegde 2007, Hallengren, Chen et al. 2013). En el modelo de ratón de la enfermedad de Huntington se ha detectado una desregulación de la homeostasis de ubiquitina (Bennett et al., 2007), así como en la atrofia espinal muscular (Wishart, Mutsaers et al. 2014), en la esclerosis lateral amiotrófica (Gilchrist, Cain et al. 2005, Hallengren, Chen et al. 2013), y en la enfermedad de Alzheimer (Lam, Pickart et al. 2000, Hegde and Upadhy 2007). También está implicada en la modificación de los microtúbulos astrales y por tanto, de los mecanismos del citoesqueleto, como la mitosis, en las zonas corticales (Kammerer, Stevermann et al. 2010). A pesar de los trabajos publicados, poco se sabe de la regulación y homeostasis de la ubiquitina en condiciones

fisiológicas normales. Así, existe una necesidad de conocer su regulación. Su estudio en eucariotas más sencillos puede ser una vía adecuada para avanzar en este conocimiento. De hecho, se ha visto que en *S. cerevisiae* estos procesos están relacionados con la eliminación de proteínas defectuosas en el núcleo (Gardner, Nelson et al. 2005).

Los protozoos parásitos son organismos unicelulares, pero complejos que sufren múltiples modificaciones durante su diferenciación para adaptarse a los diferentes huéspedes y a los ambientes físico-químicos diferentes con los que se van a encontrar a lo largo de sus ciclos vitales. Diferentes proteasas están implicadas en los procesos de diferenciación que se correlacionan con una mayor infectividad de los parásitos. Una característica del ciclo de los protozoos parásitos como *Leishmania* son los cambios morfológicos profundos que se producen durante su diferenciación en los huéspedes vertebrado e invertebrado. Estos cambios, de forma, tamaño, etc., hacen que las estructuras del citoesqueleto tengan que adaptarse a las diferentes fases del protozoo, y esto requiere unos procesos de proteólisis muy precisos y estrictamente regulados (Munoz, San Francisco et al. 2015). De hecho, se han descrito diversos procesos de regulación por el proteasoma en diferentes especies de *Leishmania*. Así, en *L. donovani* el proteasoma está relacionado con la regulación negativa de la metionina adenosil-transferasa (MAT), un enzima importante en los procesos metabólicos y su producto, la S-adenosilmetionina (AdoMet), juega un papel clave en la trans-metilación, trans-sulfuración y en la síntesis de poliaminas. Así mismo, la ubiquitinación se ha sugerido como mecanismo de regulación de mRNAs en *Leishmania major* (Bhandari, Guha et al. 2011) y como regulador del proceso de beta oxidación, esencial en la fase amastigote, a través de la proteína Ufm1 (Gannavaram, Connelly et al. 2012). La sobre expresión de ubiquitina se ha correlacionado también con la resistencia a antimoniales en *L. tropica* (Kazemi-Rad, Mohebbi et al. 2013).

En el caso de *Leishmania infantum* se ha analizado la expresión génica a lo largo del desarrollo del parásito y entre los genes sobre expresados en los promastigotes metacíclicos presentes en el tubo digestivo anterior del vector flebotomo, se han encontrado los LinJ.07.0010 y LinJ.33.2910, que analizados mediante comparación con las bases de datos se ha mostrado que se corresponden con las proteínas activadora E1 y conjugadora E2 de ubiquitina (Alcolea, Alonso et al. 2014). Lo que sugiere una posible relación con la infectividad del parásito. La proteína conjugadora de la ubiquitina LiUbc1 se ha relacionado con las proteínas del complejo promotor de la anafase (Girard, Tenthorey et al. 2015), y se ha seleccionado para su estudio en esta tesis doctoral puesto que se detectó la sobre-expresión del gen codificante en promastigotes metacíclicos aislados de la válvula estomodeal del vector *Phlebotomus perniciosus* (Alcolea, Alonso et al. 2016).

Como se ha indicado más arriba, el tratamiento de la leishmaniasis dista mucho de ser satisfactorio, dado que las drogas disponibles son tóxicas, caras y llenas de efectos secundarios, con la amenaza constante de la producción de resistencias. Por tanto, un sistema de modificación post-traducciona puede jugar un papel muy importante en la patogenia de este tipo de parásitos (Sharma, Sharma et al. 2016). Por otra parte, el conocimiento de la regulación de procesos esenciales de los mismos puede tener mucha relevancia en la detección de moléculas que puedan servir como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas drogas (Rojas, Koszela et al. 2017) . Por tanto, resulta del máximo interés el estudio de este tipo de genes, responsables de procesos importantes de regulación, concretamente en la modificación post-traducciona y degradación de proteínas. Esta circunstancia hace que aumente el interés del estudio de su estructura, función y regulación, para determinar si son susceptibles de integrarse como posibles candidatos en la lista de nuevas dianas terapéuticas para la lucha frente a la infección por *Leishmania*.

## **2. OBJETIVOS**



La proteína conjugadora de la ubiquitina E2, codificada por el gen LinJ.33.2910 (LiUbc1), es una enzima esencial en el proceso de modificación post-traducciona y degradación de las proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma. El gen codificante está sobre-expresado en los promastigotes infectivos de *Leishmania infantum* en la fase previa a la infección del mamífero. El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de esta proteína y determinar su importancia en los procesos de infectividad del parásito. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

1. Análisis de la estructura primaria y modelado molecular de la proteína LiUbc1.
2. Clonaje del gen LinJ.33.2910 de *L. infantum*, expresión en sistema heterólogo y purificación de la proteína recombinante LiUbc1.
3. Análisis de los niveles de la proteína LiUbc1 a lo largo del crecimiento y la diferenciación de promastigotes de los aislados MCAN/ES/MON1/2001 e IPER/ES/2013/ATE1FL6 de *L. infantum* en cultivo axénico.
4. Localización subcelular de la proteína LiUbc1 en *L. infantum* mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía electrónica.
5. Caracterización de la proteína LiUbc1 en promastigotes de *L. infantum* en líneas *knock-in*, posibles alteraciones en el proteoma y determinación de su influencia en la infectividad *in vitro* del parásito.
6. Evaluación de la protección inducida por la proteína LiUbc1 frente a la infección por *L. infantum* en el modelo de hámster sirio.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1 Cepas bacterianas

Se han empleado distintas cepas bacterianas para llevar a cabo los clonajes y la expresión de la proteína para su caracterización.

**Tabla 2. Listado de células de expresión**

CEPA	Genotipo	Referencia	Plásmido
<b>XL1 BLUE</b>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Agilent Technologies	pQE-30
<b>DH5α</b>	F- φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-,mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	pIRmcs3 (-) pIRmcs3-GFP (-)
<b>M15[pREP4]</b>	F- φ80 ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR	<i>QIAGEN</i>	pQE-30

#### 3.1.2 Parásitos

Se han utilizados para los experimentos dos tipos de aislados de *L. Infantum*:

1. Aislado M/CAN/ES/98/10445 (zimodema MON-1) proporcionado por los Dres. Alfredo Toraño y Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda)
2. Aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 de *L. infantum*, cuyo origen es el tubo digestivo de flebotomos capturados con trampas CDC en el foco epidemiológico de Fuenlabrada (Comunidad de Madrid)

### **3.1.3 Línea celular humana**

Los experimentos de infección *in vitro* se llevaron a cabo utilizando la línea celular humana mielomonocítica U937 (ATCC CRL1593.2). Se realizaron también en esta línea celular los ensayos de aislamiento de amastigotes de *L. infantum*. La línea celular se estableció a partir de efusiones pleurales de un paciente con linfoma histiocítico (Sundstrom and Nilsson 1976)

### **3.1.4 Animales de experimentación**

Se obtuvo un anticuerpo policlonal frente a la proteína LiUbc1 a partir de conejos de la raza New Zealand White en el servicio de experimentación animal del CIB-CSIC cumpliendo la legislación vigente (Directiva 2010/63/EU).

Para los experimentos de protección se usaron dieciséis animales de la especie *Mesocricetus auratus*. Los experimentos se llevaron a cabo en el servicio de experimentación animal del Instituto de Salud Carlos III según la normativa vigente (Directiva 2010/63/EU).

## **3.2 CULTIVOS CELULARES**

### **3.2.1 Cultivos Bacterianos**

#### **3.2.1.1 Medios de cultivo**

Se ha empleado un medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, NaCl 0.5% y extracto de levadura 0.5%) al que se le ha añadido ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µl/ml) según el gen de resistencia que contuviera el plásmido usado.

Los medios de cultivo en medio sólido se llevaron a cabo añadiendo agar al 1.5% al medio LB y de igual manera el antibiótico necesario para la selección de las colonias bacterianas. La criopreservación de las bacterias se llevó a cabo a -80°C en LB con glicerol al 20%.

#### **3.2.1.2 Transformación de bacterias competentes**

Las bacterias competentes de *E. coli* para transformación por choque térmico se prepararon mediante un tratamiento con RuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> descrito previamente (Hanahan and Meselson 1983). En primer lugar, se llevó a cabo un cultivo de la estirpe correspondiente de *E. coli* en 10 ml de medio φ (triptona peptona 20g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 0.6 g/l, KCl

0.37 g/l, pH 7.6) y se incubó a 37°C durante 16 horas en agitación orbital. Seguidamente, se diluyó el cultivo 40 veces y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) de 0,5 aproximadamente. A continuación, se enfrió el cultivo en un baño de agua-hielo (0°C) durante 15 min, se centrifugaron las bacterias a 1.800g a 4°C durante 10 min y se resuspendieron cuidadosamente en 120 ml de solución TfB I ( $RuCl_2$  100 mM,  $MnCl_2$  50 mM, acetato potásico 30 mM,  $CaCl_2$  10 mM, glicerol 15%, pH 5.8). Posteriormente, se dejó enfriar en hielo durante 15 min, se centrifugó de nuevo y se resuspendió el sedimento en 16 ml de solución tampón TfB II ( $RuCl_2$  10 mM,  $CaCl_2$  75 mM, MOPS 10 mM, glicerol 15% a pH 6.8). Por último, se congelaron las bacterias en nieve carbónica en alícuotas de 100  $\mu$ l y se conservaron a -80°C.

Para la transformación por choque térmico se mezcló una alícuota de 100  $\mu$ l de bacterias competentes con 100-200 ng en 10  $\mu$ l de ADN plasmídico. Se mantuvo esta mezcla a 4°C durante 30 min. Acto seguido, se llevó a cabo el choque térmico, incubando primero la mezcla en un baño de agua a 42°C durante 45 s, e inmediatamente después enfriándola en hielo durante 2 min. A continuación añadió 1 ml de medio LB y se incubó la mezcla a 37°C durante 1h en agitación orbital para permitir la expresión del marcador de resistencia. Por último, se sembró la mezcla en placas LB-agar con ampicilina 100  $\mu$ g/ $\mu$ l para los vectores pIRmcs3 y pQE-30 en XL1 Blue de *E. coli*, y además, kanamicina a 50  $\mu$ g/ $\mu$ l en el caso de la estirpe M15 de *E.coli* transformada con el pQE-30.

### 3.2.2 Obtención de promastigotes, amastigotes y líneas *knock-in* de *L. infantum*

#### 3.2.2.1 Procedimientos básicos de cultivo

Los cultivos de *L. infantum* y de células de la línea U937 se llevaron a cabo en un laboratorio de nivel bioseguridad 2 con una cabina de flujo laminar de tipo II. Se utilizaron frascos *Roux* y medio RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich) inactivado a 56°C durante 1h y se le añadió penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml (Thermo Fischer Scientific) al que se llamará a partir de ahora medio completo. Para los amastigotes axénicos se acidificó el medio a pH 5,5 con HCl y se esterilizó por filtración (0,22  $\mu$ m).

Los cultivos de promastigotes de iniciaron a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml y se incubaron a 27°C, mientras que los cultivos de amastigotes axénicos y células U937 se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de  $CO_2$ , a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  células/ml respectivamente. La curva de crecimiento de los promastigotes se registró cada 24h usando una

cámara de Neubauer para el recuento de los parásitos. Se usa una solución de EDTA al 10% para la carga de los promastigotes en las cámaras. Posteriormente se centrifugan los promastigotes y los amastigotes a 2000 g durante 10 min y las células U937 a 200g.

### **3.2.2.2 Aglutinación de promastigotes con lectina de cacahuete (PNA) y selección negativa**

En primer lugar, se centrifugaron promastigotes en fase estacionaria a 2000g durante 10 min en medio completo a una densidad celular de  $2 \times 10^8$  células/ml. A continuación, se incubaron con 50 µg/ml de lectina de cacahuete, PNA (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 30 min, comprobando la aglutinación y la sedimentación en el sedimento y en el sobrenadante al microscopio óptico, al igual que en el resto de las etapas del procedimiento. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de sobrenadante remanente y se llevó de nuevo al volumen inicial con medio completo con la concentración inicial de PNA y se centrifugó a 200g durante 10 min. Se centrifugó de nuevo para obtener los promastigotes PNA<sup>+</sup>, y el sobrenadante obtenido se centrifugó a continuación a 2000g para obtener los promastigotes PNA<sup>-</sup>.

### **3.2.2.3 Obtención de amastigotes intracelulares de *L. infantum* por infección *in vitro* de células U937 estimuladas.**

La línea celular humana U937 se mantuvo en medio completo en frascos Roux a 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> en sucesivos pases. La estimulación de las células se llevó a cabo con 5-forbol-1-miristato-3-acetato, PMA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 ng/ml durante 72h en portaobjetos de cultivo celular de ocho pocillos (LabTek), siendo la densidad celular  $2 \times 10^8$ /cm<sup>2</sup>. Las infecciones se realizaron a cabo durante 2 h en medio completo mezclando promastigotes de *L. infantum* con células U937 en una proporción 10:1. A continuación, se lavaron las células con medio completo a las 2 y 16 h post-infección. Cada una de las tres réplicas biológicas del experimento de infección se realizó por triplicado, ya que se fijó un portaobjetos por cada tiempo de infección estudiado (24, 48 y 72 h), con el fin de estimar el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada. Se llevaron a cabo otros tres lavados y se trataron las células con una solución hipotónica (180 µl de medio completo con 220 µl de agua corriente por pocillo) durante 5 min. Las células se sometieron a cuatro lavados con 150 µl de etanol-ácido acético 3:1 y se fijaron con la misma solución tres veces durante durante 10 min cada una. A continuación, se secaron las preparaciones al aire y se retiraron los pocillos

de la cámara de cultivo para poder teñir las células con la solución *Diff-Quick* (Dade Behring). Se llevó a cabo un lavado con agua destilada, se secaron al aire las preparaciones y se montaron con *Entellan Neu* (Merck). El porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada se estimó a partir de tres réplicas biológicas del experimento y el análisis estadístico se basó en el test de la *t* de *Student* mediante el programa *Sigmaplot 11*.

Con el propósito de obtener amastigotes intracelulares para posteriores análisis de expresión génica diferencial, se extrajo el cultivo de macrófagos infectados por raspado con una espátula estéril y se lisaron los macrófagos con 100  $\mu$ l de una solución de 0,1% SDS en RPMI 1640 durante 30s a temperatura ambiente, manteniendo así intactos los amastigotes. La lisis se detuvo mediante la adición de 1 ml de medio completo y se centrifugó, obteniendo en el sedimento los amastigotes intracelulares.

#### 3.2.2.4 Generación de líneas de promastigotes *knock-in* de *L. infantum*.

Se obtuvo una línea de promastigotes *knock-in* para la sobre-expresión del gen *LiUbc1* utilizando el vector pIRmcs3 (Alzate y col., 2006). En primer lugar, se clonó dicho gen como se describe en la sección 3.3.6. obteniendo clones recombinantes en la estirpe DH5 $\alpha$  de *E. coli*. El clon seleccionado se comprobó mediante secuenciación con el método de Sanger y se prepararon aproximadamente 0.5 mg de este plásmido recombinante y del vector sin inserto pIRmcs3 mediante el procedimiento descrito en la sección 3.3.1. Para llevar a cabo la transfección, en primer lugar se centrifugaron los promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica media y se lavaron en 10 ml de tampón de electroporación (132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM de acetato de magnesio, 90 $\mu$ M de acetato de calcio, ajustado a pH 7,0 con ácido acético) esterilizado por filtración (0,22  $\mu$ m). Seguidamente, se resuspendieron en 400 $\mu$ l de dicho tampón a una concentración final de 7x10<sup>6</sup> células/ml y se transfirieron a una cubeta de electroporación con una distancia entre los electrodos de 0,2 cm (BTX). El pulso eléctrico se aplicó en presencia del plásmido digerido (1,5 -3  $\mu$ g de ADN) mediante un electroporador *Electro Cell Manipulator 600* (BTX). Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 1,5 kV y 24  $\Omega$  durante ~0,28 ms (modo *high voltage*). Durante las primeras 24h tras el pulso de corriente eléctrica, los promastigotes se cultivaron en medio completo suplementado con 20% de HIFBS y 10% de sobrenadante de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria esterilizado por filtración (0,22  $\mu$ m). Transcurrido este tiempo, se añadió el agente de selección nourseotricina (Jena Bioscience, Jena, Alemania) a 100  $\mu$ g/ml, incrementándose la concentración a 120  $\mu$ g/ml a los siete días de cultivo. El proceso de selección

se llevó a cabo tomando como referencia los promastigotes sometidos a pulso eléctrico en ausencia de vector. Los promastigotes transfectados con los vectores pIRmcs3 se emplearon como líneas control en todos los experimentos realizados.

### 3.3 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

#### 3.3.1 Aislamiento de ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina con el kit *High pure Plasmid Isolation* (Roche Applied Science) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.3.2 Extracción de ADN genómico de *L. infantum*.

Se purificó ADN genómico de *L. infantum* siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y col. (1989), excepto la concentración de SDS. En primer lugar, se centrifugaron  $2 \times 10^9$  promastigotes en fase estacionaria a 2.000g durante 10 min a 4°C. Seguidamente, se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 8 ml de tampón de lisis constituido por Tris-HCl 10 mM pH 9,5, EDTA 0,1M pH 8,0, ARNasa A pancreática 20 µg/ml y proteinasa K 0,1 mg/ml. Se añadió inmediatamente SDS al 2% gota a gota y agitando cuidadosamente hasta completar un volumen de 10 ml. A continuación, se extrajo el ADN genómico mediante extracción líquido-líquido y precipitación como se detalla seguidamente: tres extracciones con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, emulsionando por inversión cuidadosa del tubo durante 15 min, centrifugando seguidamente a 2.000g durante 15 min y recuperando la fase acuosa; y una extracción del mismo modo utilizando cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. La precipitación del ADN genómico se realizó añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), manteniéndolo a -20°C durante al menos 30 min. Se recogió el ADN genómico precipitado por centrifugación durante 30 min a 8.500 rpm en una centrífuga *Sorvall RC-5C* con un rotor flotante *HB-4* (Dupont, Wilmington, Estados Unidos). Por último, se llevó a cabo un lavado con etanol al 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en agua *milliQ*.



### 3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras de ADN y de ARN se prepararon utilizando tampón de carga 6X (New England Biolabs). Los geles de agarosa se prepararon al 1 % p/v en tampón TAE (TrisHCl 40 mM, 37 EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM) incorporando el fluoróforo *GelRed<sup>TM</sup>* (Biotium) al 0,01% v/v. La separación electroforética se llevó a cabo a 5 V/cm (75 mA) durante 60-90min en una célula *Mini-SubCell GT* o *Wide Mini-Sub Cell GT* (BioRad) aplicando la corriente con una fuente de alimentación *PowerPac<sup>TM</sup> Basic* (BioRad). Posteriormente, se irradió el gel con luz ultravioleta (UV) y se registró la imagen mediante *ChemiDoc<sup>TM</sup> Image System* y el programa *Image Lab* (BioRad).

### 3.3.4 Análisis de ácidos nucleicos mediante espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

La concentración de ADN ( $\mu\text{g/ml}$ ) se calculó mediante un espectrofotómetro para micro-volúmenes *NanoDrop ND-1000* midiendo la absorbancia a 260 nm (Thermo Fisher) multiplicando por el factor 50. Se tomó la razón  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  como indicador de pureza.

### 3.3.5 Purificación de ADN.

Para la electroporación y otros procedimientos, se purificaron las muestras de ADN con alta concentración de sales disueltas mediante precipitación con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C durante 1 . Posteriormente, se centrifugó la muestra a 13.000g durante 20 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70%. Finalmente, se deja el ADN a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen adecuado de agua milliQ según las aplicaciones posteriores.

### 3.3.6 Clonaje en vectores de expresión

#### 3.3.6.1 Plásmidos

Se utilizaron los vectores plasmídicos pIRmcs3 y pQE30 con diferentes fines (Tabla 3).

**Tabla 3. Plásmidos empleados en la presente tesis doctoral.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pIRmcs3	Clonaje del gen codificante de la proteína E2 (Linj.33.2910) para la generación de las respectivas líneas <i>knock-in</i> de <i>L. infantum</i> .	Hoyer y col., 2004
pQE-30	Clonaje y expresión del gen codificante de la proteína E2 (Linj.33.2910) de seis histidinas en N-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad con níquel.	QIAGEN

### 3.3.6.2 Preparación de los insertos.

Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores *Fw*: TAAGGATCCCCTCTGACGGCGGCT y *Rw*: CAAAAGCTTTCAGATGCGGCGCAGC a partir de los extremos de la secuencia del gen *LiUbc1* de *L. infantum* a partir de la base de datos TriTrypDB ([www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org)) incorporando en sus extremos 5' las dianas para las endonucleasas de restricción BamHI y HindIII. La amplificación de los insertos utilizando dichos oligonucleótidos se llevaron a cabo como se indica a continuación: 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 98 °C durante 20 s, 60 °C durante 15 s y 72 °C durante 2 min; y la extensión final a 72 °C durante 3 min. Se empleó ADN genómico de *L. infantum* como molde y se añadió a la mezcla de reacción ADN polimerasa *Kapa HiFi HotStart* (5 U/μl) junto al tampón de reacción con MgCl<sub>2</sub> y la mezcla de dNTPs en las proporciones indicadas por el fabricante. Se comprobó el tamaño de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se extrajo el inserto de la agarosa con *Qiaquick Gel Extraction kit* (Qiagen). Se precipitó el producto de PCR con etanol y se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante (New England Biolabs). Una vez realizada la separación electroforética, se extrajo nuevamente el inserto digerido de la agarosa y se precipitó con etanol. La concentración final de ADN se cuantificó mediante espectroscopía de absorción UV.

### 3.3.6.3 Preparación de los vectores.

Se digirió el ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (New England Biolabs). Seguidamente, se desfosforilaron los extremos cohesivos con fosfatasa de gamba antártica (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante para aumentar la eficiencia del proceso, al minimizar la religación del plásmido. A continuación, el

vector digerido y desfosforilado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajo empleando *Qiaquick Gel Extraction kit* (Qiagen). Para eliminar las sales disueltas, se precipitó el ADN con etanol como se ha indicado anteriormente. Por último, se resuspendió el ADN en agua milliQ y se cuantificó mediante espectrofotometría de absorción UV.

#### **3.3.6.4 Ligación.**

Se utilizó la ADN ligasa de T4 (New England Biolabs) para llevar a cabo la reacción de ligación a 16°C durante 16 h siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción fue 10 µl. Finalizada la reacción, se transformaron con esta mezcla las cepas de *E. coli* correspondientes mediante choque térmico.

#### **3.3.6.5 Secuenciación de ADN.**

Se comprobaron los constructos mediante secuenciación por el método de Sanger (Secugen S.L., CIB-CSIC), alineando la secuencia obtenida frente a la correspondiente secuencia putativa del genoma de *L. infantum* obtenida de la base de datos *TriTrypDB*.

### **3.4 EXPRESIÓN EN SISTEMA HETERÓLOGO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.**

#### **3.4.1 Expresión de los genes codificantes de las proteínas recombinantes.**

##### **3.4.1.1 Expresión de la proteína conjugadora de la ubiquitina E2 en la cepa M-15 de *E. coli*.**

Se clonó el gen codificante de la proteína conjugadora de la ubiquitina E2 recombinante en el vector pQE-30 (sección 3.4.6) para la sobre-expresión en la cepa M15 de *E. coli* incluyendo una secuencia de 6 His en su extremo N-terminal.

Se iniciaron preinóculos bacterianos (~25 ml de cultivo) a partir de clones conservados a -80°C en LB-glicerol y se cultivaron durante ~16 h a 37°C en LB-ampicilina (100µg/ml) kanamicina (50µg/ml) suplementado con MnCl<sub>2</sub> 1mM. Partiendo de estos preinóculos, se

iniciaron cultivos de 1 l hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0,5 ( $DO_{600nm}$ ). A continuación, se indujo la expresión del gen recombinante añadiendo 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron los cultivos en agitación durante 4 h a 30°C. Los cultivos se centrifugaron a 4.000g durante 15 min a 4°C y el sedimento se lavó con un volumen de 50 ml de NaCl al 0,9%. En este punto se puede conservar el sedimento a -20°C. La lisis se llevó a cabo en 40 ml de un tampón a pH 8 que contiene KCl 1M, imidazol 30 mM, Brij 58 1%, glicerol 10%, benzamidina 1 mM y un comprimido de cocktail de inhibidor de proteasas (Roche). Para facilitar la ruptura de la pared celular, se llevaron a cabo 5 ciclos de sonicación de 1 min en hielo seguidos de 2 min de enfriamiento. A continuación, se centrifugó durante 1 h a 27.000g a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón de unión (hidrocloruro de guanidinio 5 M, imidazol 40 mM). Seguidamente, se resuspendió el sedimento en el tampón de unión y se centrifugó durante 1 h a 27.000g. El sobrenadante resultante fue recuperado y almacenado a -80°C para la purificación en condiciones desnaturizantes de las proteínas recombinantes sobre-expresadas (sección 3.4.2).

### 3.4.2 Purificación de proteínas recombinantes.

Se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a  $Ni^{2+}$  utilizando columnas *HiTrap FF* de 1 ml el sistema *FPLC ÄKTA* (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) a temperatura ambiente. Se filtró (0,22  $\mu$ m) el último sobrenadante obtenido a partir del extracto proteico preparado según se ha descrito en la sección 3.4.1. y se añadió a la columna con níquel previamente equilibrada con tampón de unión a un flujo de 0,5 ml/min. Seguidamente, se lavó con 30 ml de tampón de unión a un flujo de 1 ml/min. La elución en gradiente lineal se realizó con los tampones de unión y elución expuestos en la Tabla 4, recogiendo fracciones de 0,5 ml que fueron almacenadas a 4°C.

**Tabla 4. Tampones de unión y elución empleados para la purificación de LiUbc1 recombinante.**

Purificación de proteínas en condiciones desnaturizantes	
Tampón de Unión	Hidrocloruro de guanidinio 5 M Imidazol 50 mM
Tampón de Elución	Hidrocloruro de guanidinio 5 M Imidazol 700 mM

### 3.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

#### 3.5.1 Obtención de extractos proteicos totales de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. infantum*.

Se centrifugaron  $2 \times 10^8$  promastigotes a 2000g durante 5 min y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón lisis (urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, CHAPS 4 % p/v, DTT 50 mM, Tritón X-100 1%, una tableta de cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y 1 U de DNasa I (New England Biolabs). Se mezcló por inversión lenta durante 30 min a 4°C y se centrifugó posteriormente a 8.000g durante 10 min a 4°C. Se recuperó y almacenó el sobrenadante a -80°C.

#### 3.5.2 Obtención de extractos proteicos totales de amastigotes de *L. infantum* obtenidos por infección *in vitro* de células U937.

Para recuperar los amastigotes obtenidos por infección *in vitro* de células U937 en frascos Roux, fue necesario desprender las células con un raspador. A continuación, el sedimento celular se centrifugó a 250g durante 10 min y fue resuspendido en un volumen adecuado para realizar el recuento. Seguidamente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100  $\mu$ l de solución de lisis A (0,1% SDS en RPMI 1640) por cada 106 macrófagos, agitando vigorosamente durante 1 min y dejándolas reposar durante 30 segundos adicionales a temperatura ambiente. La lisis se detuvo rápidamente mediante la adición de 1 ml de medio completo. Se sedimentaron los amastigotes a 15.000g durante 2 min y se lavaron una vez con PBS. Por último, se realizó el recuento de los amastigotes en cámaras de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania) y se resuspendieron en el tampón de lisis B (urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, CHAPS al 4 % p/v, DTT 50 mM, Tritón X-100 al 1%, un comprimido del cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y nucleasa *Benzonase* 50  $\mu$ g/ml (Merck Millipore).

#### 3.5.3 Cuantificación de proteínas.

Se diluyeron alícuotas de la proteína LiUbc1 recombinante purificada y de los extractos proteicos en agua *milliQ* (1:5 ó 1:10) y se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). A continuación, se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de placas *Varioskan<sup>TM</sup> Flash* (Thermo Fisher Scientific).

### 3.5.4 Estudio de los niveles de expresión de proteínas por *Western blot*.

Se evaluaron semicuantitativamente los niveles de expresión de la proteína LiUbc1 en el aislado silvestre, en la línea de promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 y en la línea control pIRmcs3 mediante *Western blot* siguiendo un protocolo previamente descrito (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1997). Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de promastigotes a lo largo de su ciclo de diferenciación (día 1 a día 6) y/o de *amastigotes-like* y/o amastigotes intracelulares. Los extractos proteicos previamente cuantificados se separaron mediante SDS-PAGE al 10% (20 µg/ pocillo) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 0,45 µm (BioRad). Para el estudio de los niveles de expresión de LiUbc1 tanto en la cepa silvestre como en el transfectante pIRmcs3-LiUbc1 se empleó el anticuerpo policlonal primario anti-LiUbc1 (1:100), que se generó como se detalla en la sección 3.8. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo (Dako, Agilent) a una dilución 1:2.000.

Como control interno de carga de los extractos proteicos se reincubaron las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo policlonal primario de conejo anti-GAPDHg (1:10.000), que fue cedido por el Dr. Paul A. Michels, utilizando posteriormente el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo conjugado con HRP (1:2000) (Dako, Agilent). Como paso previo a esta reincubación, se llevó a cabo un procedimiento de *stripping* incubando las membranas en agitación manual cada 5 min con un tampón que contenía β-mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2% y Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8. Esta incubación se llevó a cabo a 50°C durante 45 min. A continuación, se lavaron las membranas con PBS-Tween 20 al 0,1% y se incubaron con solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0,1% con leche desnatada al 5%) durante toda la noche. Para la detección por quimioluminiscencia se utilizó *ECL Western blotting Detection kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 60s. Se secó el exceso de reactivo y se detectó la señal con el analizador *Image Reader LAS-3000* (GE Healthcare).

### 3.5.5 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para la separación de proteínas mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 10%, se incubaron las muestras a 95°C durante 10 min en tampón de carga (TrisHCl 0,3 M a pH 6,8, azul de bromofenol 0,0001% [p/v], glicerol al 15% [v/v], SDS al 6% [p/v], ditioneitol (DTT) al 5% [p/v]), y a continuación se aplicó una corriente eléctrica de 120 V durante 2h en presencia del tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% [p/v]) en una célula de

*MiniProtean® II* (BioRad). Se tiñeron las proteínas con *Coomassie Brilliant Blue* (USB, Cleveland, Estados Unidos) y se destiñó el gel durante 30 min con ácido acético 3.7% [p/v], metanol 10% [v/v] en agua milliQ. Se utilizó el marcador de masa molecular preteñido *PageRuler Plus Prestained* (Thermo Fisher Scientific).

### **3.6 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE *L. INFANTUM* POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.**

Se sedimentaron  $2 \times 10^5$  promastigotes sobre un área circular de  $0,2 \text{ cm}^2$  en un portaobjetos y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron tres veces con PBS en una jarra Couplin durante 5 min. La permeabilización de las células se llevó a cabo con Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 5 min, y se repitieron los lavados a continuación. El bloqueo se llevó a cabo con PBS-Tween 20 al 0,1% con leche desnatada al 5% a 37°C en una cámara húmeda. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario conejo anti-LiUbc1 en solución de bloqueo correspondientes a una dilución 1:50 durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se lavó de nuevo con PBS durante 5 min y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo *Alexa Fluor 488* (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo en la cámara húmeda durante 1h en oscuridad. Se añadieron 10 µl de una disolución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) a 10 µg/ml en PBS 10 min antes de finalizar la anterior incubación. Por último, se llevaron a cabo 4 lavados con PBS en oscuridad y se montaron las preparaciones con *Mowiol 4-88* (Sigma-Aldrich). En el caso de los controles negativos se utilizó suero pre-inmune en lugar del anticuerpo primario a la misma dilución. Se obtuvieron las imágenes en un microscopio láser confocal espectral *Leica TCS-SP5-AOBS*, ajustando previamente la intensidad del láser y la ganancia a cero con el control negativo (suero preinmune 1:50).

### **3.7 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE *L. INFANTUM* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Las muestras para el estudio por microscopia electrónica se procesaron en el servicio de microscopia electrónica del Instituto de Salud Carlos III por la Dra. Esperanza Pérez Pastrana. Primero se procedió a la inclusión en Lowicryl de los cultivos celulares. Se fijó en una mezcla de

2% paraformaldehído y 0,2% glutaraldehído en tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,4), 45 min. a 4°C. A continuación se lavó en tampón de cacodilato sódico 0,1 M y sacarosa (4,5%) 30 min. Opcionalmente se puede cambiar a 0,1 % de paraformaldehído en tampón de cacodilato. Se almacenó a 4°C toda la noche o hasta 72h. El siguiente paso es lavar en tampón de cacodilato sódico 0,1 M y sacarosa (4,5%) durante 1 hora, tras lo cual, se procede a una deshidratación gradual de la siguiente manera:

-Etilenglicol	50%	30 min	0 °C
-Etanol	50%	30 min	-20 °C
-Etanol	70%	30 min	-35 °C
-Etanol	80%	30 min	-35 °C
-Etanol	90%	30 min	-35 °C
-Etanol	100%	30 min	-35 °C
-Etanol	100%	30 min	-35 °C

A continuación, se preparó una solución *Lowicryl K4M* (Crosslinker (A) 4,5 gr, Monomer (B) 25,5 gr, Initiator (C) 0,15 gr) y se realizó una infiltración con el siguiente esquema:

-K4M:Etanol 100% (1:1)	60 min	-35 °C
-K4M:Etanol 100% (2:1)	60 min	-35 °C
-K4M puro	60 min	-35 °C
-K4M puro	overnight	-35 °C

El siguiente paso es la inclusión en cápsulas de gelatina colocadas en una gradilla sobre hielo picado. Las cápsulas se llenan hasta el borde y se tapan, ya que la polimerización no ocurre en presencia de oxígeno. Y por ultimo se procedió a la polimerización con luz ultravioleta 24 h a -35 °C o con luz ultravioleta de 1 a 3 días a temperatura ambiente. Una vez que se tienen las preparaciones listas, se procedió al protocolo de incubación con el anticuerpo anti-LiUbc1. Primero se procedió al bloqueo en tampón de incubación, 60 min a 37 °C. Después se incubó con el anticuerpo anti-LiUbc1 60 min a 37°C. Se hicieron 4 lavados de 5 min. Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal: 1/10 en tampón de lavado, 60 min a 37 °C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min, otros 3 lavados de 5 min en presencia de 0,1 % Tritón X-100 y otros tres lavados de 5 min en agua bidestilada. Se realizó un contraste utilizando acetato de uranilo 1% en agua bidestilada durante 10 min y, por último, se lavó con agua bidestilada 1min.



### 3.8 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

La proteína LiUbc1 fue dializada a 4°C frente a PBS y, para la producción del anticuerpo anti-LiUbc1, se inmunizaron conejos de la raza *New Zealand White* con la proteína purificada (sección 3.4.2). Antes de la inoculación de los antígenos, se tomaron 5 ml de sangre de la vena marginal de la oreja con la finalidad de obtener el suero pre-inmune.

El protocolo de inmunización de inició con 0,5-1 mg de antígeno. Para ello se preparó una emulsión mezclando 0,5 ml del antígeno en solución salina con 0,5 ml de adyuvante completo de Freund. Las siguientes tres inmunizaciones se realizaron con la mitad de la dosis inicial emulsionada con el adyuvante incompleto de Freund. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea con un intervalo de tiempo de 3 semanas. Una vez administrada la cuarta dosis, se extrajeron aproximadamente 5 ml de suero y se tituló el anticuerpo frente a la proteína recombinante purificada y frente a extractos proteicos de *L. infantum*. El sacrificio del animal anestesiado se realizó mediante punción intracardiaca con el fin de obtener un volumen aproximado de 75 ml de suero.

### 3.9 ANÁLISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS LC-MS/MS

#### 3.9.1 Preparación de muestras para ver las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de *LiUbc1*.

Para el marcaje de las muestras se utilizó un kit *8-plex iTRAQ* (AB SCIEX) siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. 50 µg de proteína procedente del lisado de las células reducido con 5 µg de tripsina toda la noche a 37°C. La mezcla de péptidos fueron marcados con los reactivos iTRAQ 113, 114, 115, 117, 118 y 121, llevando a cabo cambios de marcaje entre las distintas réplicas. Las muestras marcadas con iTRAQ se agruparon y se purificaron mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando cartuchos MCX (Waters) para eliminar el reactivo iTRAQ no incorporado y otros materiales no peptídicos. Los péptidos se eluyeron con 1 ml de MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9 vol/1 volumen), se secaron y se fraccionaron mediante cromatografía líquida, se desalaron utilizando puntas *C18 OMIX* (Agilent Technologies) y se mantuvieron a -80 °C hasta el análisis de LC-MS/MS .

### 3.9.2 Preparación de las muestras para identificación de LiUbc1 mediante espectrometría de masas LC-MS.

Las muestras se disolvieron primero en tampón de muestra, se desnaturalizaron, se cargaron en un gel de SDS al 10% y el gel se tiñó con Coomassie coloidal. Las bandas de proteínas se dividieron horizontalmente en dos porciones similares y cada una se cortó en fragmentos pequeños y se realizó el protocolo de digestión con tripsina (Cristobo, Larriba et al. 2011).

### 3.9.3 Análisis LC-MS/MS de las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de *LiUbc1*.

Para la cuantificación de iTRAQ, las mezclas de péptidos marcados y secadas al vacío se reconstituyeron en ácido fórmico al 0,1%. Luego, los péptidos se atraparon en una precolumna *Acclaim PepMap 100* (Thermo Scientific) y se eluyeron en una columna *Acclaim PepMap C18*, de 25 cm de largo, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Thermo Scientific). El gradiente se realizó durante 120 min usando un *Easy-nLC* (Proxeon) a un caudal de 250 nl/min. Luego, los péptidos se escanearon y se fragmentaron con una trampa de iones lineal, *Orbitrap Velos* (Thermo Scientific). El Orbitrap Velos se operó en modo dependiente de los datos para cambiar automáticamente entre MS y MS/MS. Se obtuvieron espectros de MS de exploración completa desde m/z 400 hasta 2000 después de la acumulación hasta un valor objetivo de 106 en el Orbitrap a una resolución de 60.000 a m/z 400. Para la calibración de masa interna, utilizamos el ion 445.0 para la masa de bloqueo. Se habilitó la detección del estado de carga y se excluyeron los precursores con estado de carga desconocido ó 1. Después de la exploración de los datos, se seleccionaron los 10 iones precursores más intensos para la fragmentación CID-HCD MS/MS. La identificación de péptidos se realizó en ambos espectros CID y HCD, y la cuantificación de los iones indicadores iTRAQ se realizó en HCD, que se llevó a cabo con un exceso de energía de colisión para maximizar efectivamente la abundancia de los iones indicadores. Para la fragmentación CID, el valor objetivo se estableció en 10,000 ms y la energía de colisión normalizada en 35%. Para HCD, el valor objetivo se estableció en 50,000 y la energía de colisión se estableció en 60%. Se aplicó exclusión dinámica durante 45 s.

#### **3.9.4 Análisis de las muestras para la identificación de LiUbc1 mediante espectrometría de masas LC-MS.**

Todas las separaciones de péptidos se llevaron a cabo en un sistema nano *Easy-nLC 1000* (Thermo Scientific). Para cada análisis, la muestra se cargó en una precolumna *Acclaim PepMap 100* (Thermo Scientific) y se eluyó en un *PepLCC C18* de RSLC, de 15 cm de largo, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Thermo Scientific). El caudal de la fase móvil fue de 300 nL/min utilizando ácido fórmico al 0,1% en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo al 100% (disolvente B). El perfil del gradiente se estableció de la siguiente manera: 0-35% de disolvente B durante 90 min, 35%-100% de disolvente B durante 4 min, 100% de disolvente B durante 8min. Se inyectaron 4  $\mu\text{L}$  de cada muestra.

El análisis de MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas *Q Exactive* (Thermo Scientific). Para la ionización, se utilizaron 1800 V de tensión de unión líquida y 270 °C de temperatura capilar. El método de exploración completa empleó una selección masiva  $m/z$  400–1500, una resolución Orbitrap de 70,000 (en  $m/z$  200), un valor objetivo de control automático de ganancia (AGC) de  $3e6$  y tiempos de inyección máximos de 100 ms. Después de un muestreo inicial, se seleccionaron los 10 iones precursores más intensos para la fragmentación, que se realizó con una energía de colisión normalizada de 27 eV. Las exploraciones MS/MS se adquirieron con una masa inicial de  $m/z$  100, el objetivo de AGC fue  $2e5$ , resolución de 17,500 (a  $m/z$  200), umbral de intensidad de  $8e3$ , una ventana de 2  $m/z$  unidades y el máximo de TI fue de 100 ms. La detección del estado de carga se habilitó para rechazar los iones protonados no asignados, con carga individual e iguales o mayores de siete. Se utilizó un tiempo de exclusión dinámica de 20 s para discriminar contra los iones seleccionados previamente.

#### **3.9.5 Análisis de datos del espectrómetro de masas para la identificación de LiUbc1 mediante espectrometría de masas LC-MS.**

Los datos de MS se analizaron con *Proteome Discoverer* (versión 1.4.1.14) (Thermo) utilizando flujos de trabajo estandarizados. Los archivos de espectros de masas \*.raw se buscaron contra *L. infantum* JPCM5 (8062 secuencias de proteínas de entrada) utilizando el motor de búsqueda *SEQUEST*. La tolerancia de la masa del precursor y del fragmento se ajustó a 10 ppm y 0,02 Da, respectivamente, permitiendo un grado de libertad de 2 escisiones, la carbamidometilación de cisteínas como una modificación fija, la oxidación de metionina y la acetilación N-terminal como una modificación variable. Los péptidos identificados se filtraron

utilizando el algoritmo 9 (Kall, Canterbury et al. 2007) de Percolator con un umbral de valor q de 0.01.

### **3.9.6 Análisis de datos del espectrómetro de masas de las alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de *LiUbc1*.**

Los datos de MS se analizaron con *Proteome Discoverer* (versión 1.4.0.288) (Thermo) utilizando flujos de trabajo estandarizados. La cuantificación relativa se determinó utilizando las exploraciones MS/MS de péptidos marcados con iTRAQ. Los archivos de espectros de masas \*.raw se buscaron en la base de datos *L. infantum* JPCM5 (8062 secuencias de proteínas de entrada) utilizando el motor de búsqueda Sequest. La tolerancia de la masa del precursor y del fragmento se ajustó a 10 ppm y 0,8 Da, respectivamente, permitiendo una tolerancia de dos cortes, modificaciones del iTRAQ de la lisina y el N-terminal, carbamidometilación de cisteínas como una modificación fija y oxidación de la metionina como una modificación variable. Los péptidos identificados se filtraron utilizando el algoritmo de *Percolator* con un umbral de valor q de 0.01. Para la cuantificación relativa, el conjunto de datos resultante se corrigió mediante el factor de distribución isotópica del ión indicador y se excluyeron los péptidos con interferencia de aislamiento >25%. Se calcularon las relaciones \*iTRAQ para cada proteína. Los datos se normalizaron aplicando la distribución normal utilizando los valores medianos. Posteriormente, se promediaron las relaciones iTRAQ para cada proteína cuantificada en ambos duplicados y se calculó la desviación estándar. Las proteínas fueron seleccionadas en celdas que expresan cuando se muestra un cambio de  $\geq 1.5$  relativo a las muestras de control.

## **3.10 ESTUDIO DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA PROTEÍNA *LiUbc1* FRENTE A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *L. INFANTUM*.**

### **3.10.1 Diseño experimental**

Se inocularon 20  $\mu\text{g}$  de proteína *LiUbc1* recombinante en 1 ml de PBS intraperitonealmente en hámsters sirios. Se usó PBS para el grupo control. La segunda inoculación fue realizada 3 semanas después. A las 5 semanas se realizó el reto con  $10^7$  promastigotes procedentes del aislado MCAN/ES/98/10445 en 200  $\mu\text{l}$  de PBS dos semanas

después de la segunda inoculación. Los animales fueron anestesiados y sacrificados por punción intracardiaca siete semanas después de la infección.

### 3.10.2 Evaluación de la presencia del parásito en hígado y bazo

Para realizar el análisis de dilución límite, el hígado y el bazo fueron extraídos en asepsia, pesados y homogeneizados en un volumen final de 3 ml para determinar la presencia del parásito mediante diluciones seriadas. La homogeneización fue realizada empleando el medio *Drosophila Schneider's* suplementado con 10% de HIBS (Hy Clone, Thermo Fisher Scientific®), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (50 mg/ml) (Lonza®), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich®) y 1% orina estéril. Cuatro alícuotas de 200 µl de cada homogeneizado fueron sembradas en la primera fila de una placa de 96 pocillos y se hicieron 6 diluciones seriadas (de 1 a 1024). La placa fue incubada a 27 °C durante quince días. Para estimar la carga parasitaria mediante dilución límite, las placas fueron analizadas en busca de crecimiento de promastigotes con un microscopio invertido con un aumento 200x. La carga parasitaria fue calculada como la media geométrica ( $M_G$ ) de la dilución límite del inverso de la más alta dilución en la que se vieron promastigotes (Buffet, Sulahian et al. 1995). La media geométrica de la dilución límite fue calculada haciendo la media de las 4 réplicas. Conociendo la  $M_G$ , el volumen total de homogeneizado y el peso de los órganos fue posible calcular el número total de parásitos por volumen de órgano (Tabla 8).

### 3.10.3 Evaluación de la presencia de IgG en hígado y bazo

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante 20 minutos y fue centrifugada a 1000g a temperatura ambiente durante 10 min. El suero fue almacenado a -80 °C y usado posteriormente para la determinación de IgG total frente al antígeno soluble de *L. infantum* (SLA) mediante ELISA. Primero, se tapizó una placa de fondo plano con 100 µl de una solución de 10 µg/ml SLA en buffer carbonato-bicarbonato durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se bloqueó con una solución 1% de BSA en PBS y se lavó tres veces con una solución de 0,1 % BSA y 0,03% Tween 20 en PBS. A continuación, se añadieron 100 µl de una muestra de suero 1:20 a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó proteína A (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 0,19 µg/ml usando una solución de lavado. Las muestras se lavaron antes y después de la incubación, realizada con 100 µl de la solución de proteína A durante 2 horas a temperatura ambiente. El

último lavado se realizó con PBS. Se disolvió una tableta de dihidrocloruro de O-fenilendiamina (OPD) en 12 ml de buffer citrato (5,2 mM ácido cítrico, 12,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 5) y 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de dicha solución a cada pocillo y se dejó el desarrollo de la reacción colorimétrica durante 20 min. La reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de una solución SDS al 1%. La absorbancia se leyó a 450 nm usando *Microplate Reader 680* (BioRad®) y el software *Microplate Manager 5.2.1* (BioRad®).

### 3.11 Análisis bioinformático

Los alineamientos fueron realizados usando la base de datos *NCBI Blast*® y el software *Clustal Omega*. Los modelados moleculares se realizaron empleando los software *CPHmodels 3.2* e *i-Tasser* utilizando la base de datos *Protein Data Bank*.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA CONJUGADORA DE UBIQUITINA E2 (LiUbc1).

El análisis comparativo de la proteína conjugadora de la ubiquitina E2 (Ubc1), codificada por el gen LinJ.33.2910 (LiUbc1), fue llevado a cabo con las secuencias de distintos ortólogos en la familia de los tripanosomátidos para estudiar el grado de conservación. Éste ha revelado que la proteína está altamente conservada (Figura 12, Tabla 5). Esta proteína tiene un peso molecular de 26 kDa, un punto isoelectrico de 7,13, consta de 726 nucleótidos y 241 aminoácidos. Como se puede ver, hay diferencias entre las especies del género *Leishmania* y las de otros géneros de la familia Trypanosomatidae.

L. infantum	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPADSMSEYHFDLDGPEGTPFAAGRFRHVALLIF
L. donovani	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPADSMSEYHFDLDGPEGTPFAAGRFRHVALLIF
L. braziliensis	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPSDSISEYHVDLDGPEGTPFAAGRFRHVLLVF
L. major	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPSDSMSEYHFDLDGPEGTPFAAGRFRHVLLIF
L. mexicana	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRQSDSMSEYHFDLDGPEGTPFAAGRFRHVLLIF
T. cruzi	1	MSIGASAMRLTMRQMQEVEHPVDGVQVRPSDNLSELLFDLDGPEGTPFSGGTFHVLLVF
C. fasciculata	1	MPLTAAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPSSETMSEYHFDLDGPESTPFAAGRFRHVLLIF
L. infantum	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNISERGDICVNALKRDWAPTLGLRHILVVIRCLLIEPNPE
L. donovani	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNISERGDICVNALKRDWAPTLGLRHILVVIRCLLIEPNPE
L. braziliensis	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNISERGDICVNALKRDWSSSTLGLRHILAVIRCLLIEPNPE
L. major	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNISERGDICVNALKRDWSPMLGLRHILVVIRCLLIEPNPE
L. mexicana	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNISERGDICVNALKRDWSPTLGLRHILVVIRCLLIEPNPE
T. cruzi	61	EEQYPEIPPPGGVFRRTKIFHPNVAEKGDICVNVLKQDWKPSLGLRHVLTTIRCLLIEPNPE
C. fasciculata	61	DEQYPEVPPKGFRTKIFHPNVAERGDICVNALKRDWTPNVGLRHILAVIRCLLIEPNPE
L. infantum	121	SALNEEAGRLILEEYAAVERKAAMYTINAARPNGVPRFTLPEVQAEKASSLVTADASAP
L. donovani	121	SALNEEAGRLILEEYAAVERKAAMYTINAARPNGMPRFTLPEVQAEKASSLVTADASAP
L. braziliensis	121	SALNEEAGRLILEEYAAVERKAAMYTINAARPNGVPRFTLPEAEKASSATADISTG
L. major	121	SALNEEAGRLILEEYAAVERKAAMYTINAARPNGVPRFTLPEVKAEKASSVTAAGASAG
L. mexicana	121	SALNEEAGRLILEEYAAVERKAAMYTINAARPNGAPRFTLPEAKVEKASSSVTADASAP
T. cruzi	121	SALNEEAARLLLEDVDAVRRKAEMMTKIHAMKGTPLHDVPPFLSDDGRENGQLLSRGT
C. fasciculata	121	SALNEEAGRLLEDVATYERKAAMYTINAARPDGAPRYTLPGEEGRAPAATSAAPTEAV
L. infantum	181	VAGESGASSTTAAASASSMANGSTPSTATRRLTLSEANCHPGATAAEKAEKSKKKALRR
L. donovani	181	VAGESGASSTTAAASASSMANGSTPSTATRRLTLSEANCHPGATAAEKAEKSKKKALRR
L. braziliensis	181	VDANSGATLTAGASSLTTGDSVPSASARKLAPSEANCHRCGNAATDKVEKSKKKALRR
L. major	181	AAADSGASATATAAASASSMANGGAPSTATRGTLTLSEANCHPGSATAAEKAEKSKKKAL
L. mexicana	181	VNADSGASATTPAASASSMANSSAPSTATRRLTLSEANCHPGSATAAEKAEKSKKKALRR
T. cruzi	181	ANVGSASLPASEGFVSSQLRNASESALNKRSAVSGTSTNVVASKKAVEKKRAALKRI---
C. fasciculata	181	SGGEASVPVGSRLTPSEANCHPGSAAAADKVEKSKKEAEKKKKALRRI-----
L. infantum	241	I--
L. donovani	241	I--
L. braziliensis	241	I--
L. major	241	RRI
L. mexicana	241	I--
T. cruzi		---
C. fasciculata		---

Figura 12. Alineamiento comparativo de la estructura de la proteína LiUbc1 con otros géneros de la familia Trypanosomatidae. La figura representa en una escala de grises en más oscuro los residuos más conservados y en tonos grises los residuos menos conservados.



**Tabla 5. Análisis del grado de homología de la proteína LiUbc1 en el género *Leishmania*, *Trypanosoma* y otros organismos eucariotas.** Se han comparado las secuencias aminoacídicas de distintas especies determinando sus niveles de homología. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de la secuencia analizada. Por ejemplo, en el caso de *Homo sapiens*, el porcentaje de lectura de la secuencia se reduce al 51% con una identidad del 31% (ver el texto).

Especies	% de homología
<i>Leishmania donovani</i>	99
<i>Leishmania major</i>	92
<i>Leishmania mexicana</i>	92
<i>Leishmania braziliensis</i>	80
<i>Crithidia fasciculata</i>	82
<i>Trypanosoma cruzi</i>	52
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	38
<i>Homo sapiens</i>	31
<i>Xenopus laevis</i>	30
<i>Mesocricetus auratus</i>	28
<i>Drosophila melanogaster</i>	27
<i>Arabidopsis thaliana</i>	27

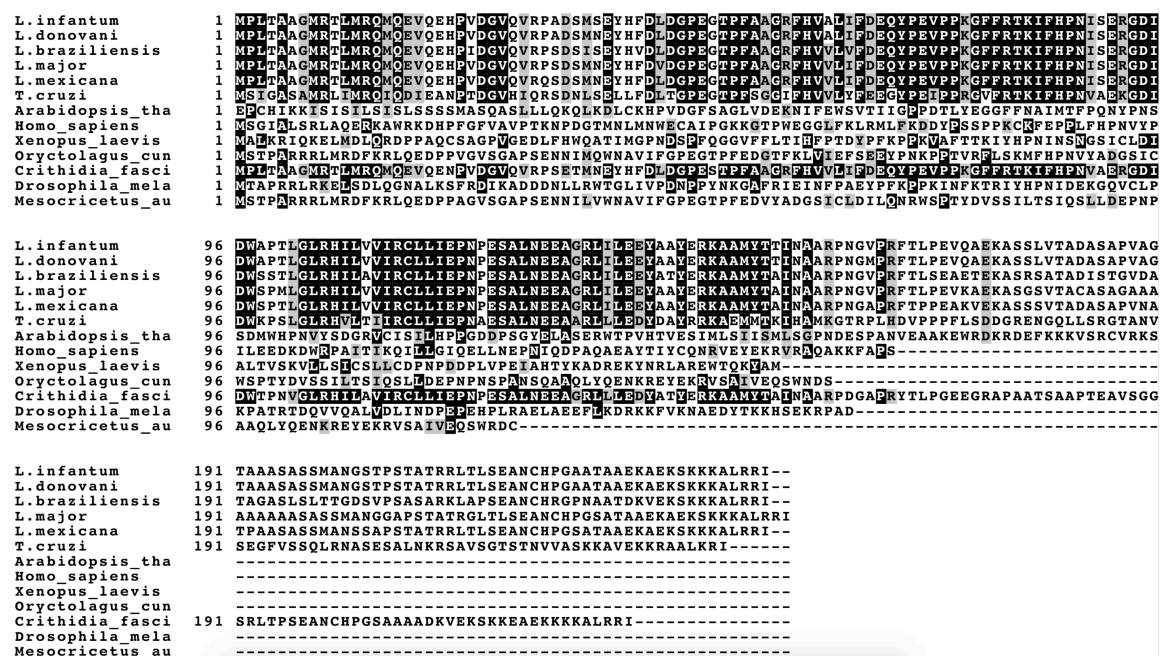
Los resultados obtenidos muestran que el grado de conservación de la proteína es muy elevado dentro del género *Leishmania*. Fundamentalmente, en las especies del subgénero *Leishmania*. La homología disminuye con la especie del subgénero *Viannia*. Esta diferencia aumenta aún más en especies de distinto género dentro de la familia de tripanosomátidos como *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia fasciculata*. Existen diferencias entre las especies de *Leishmania* y otras especies de la familia Trypanosomatidae, en cuanto a la secuencia de LiUbc1. Dentro del género *Leishmania* la proteína está más conservada. La homología de LiUbc1 con ortólogos de anfibios y de mamíferos, incluido el hombre, es baja, con valores cercanos al 30%. En el caso de *Homo sapiens*, la homología es del 31%. El elevado grado de conservación que existe con el ortólogo de *C. fasciculata* (82%) (Figura 13, Tabla 5) se podría explicar porque es un

tripanosomátido mas próximo al género *Leishmania* que a *Trypanosoma* (Alcolea, Alonso et al. 2014). Dentro de la familia de tripanosomátidos, se produce una disminución en *T. cruzi* (52%).

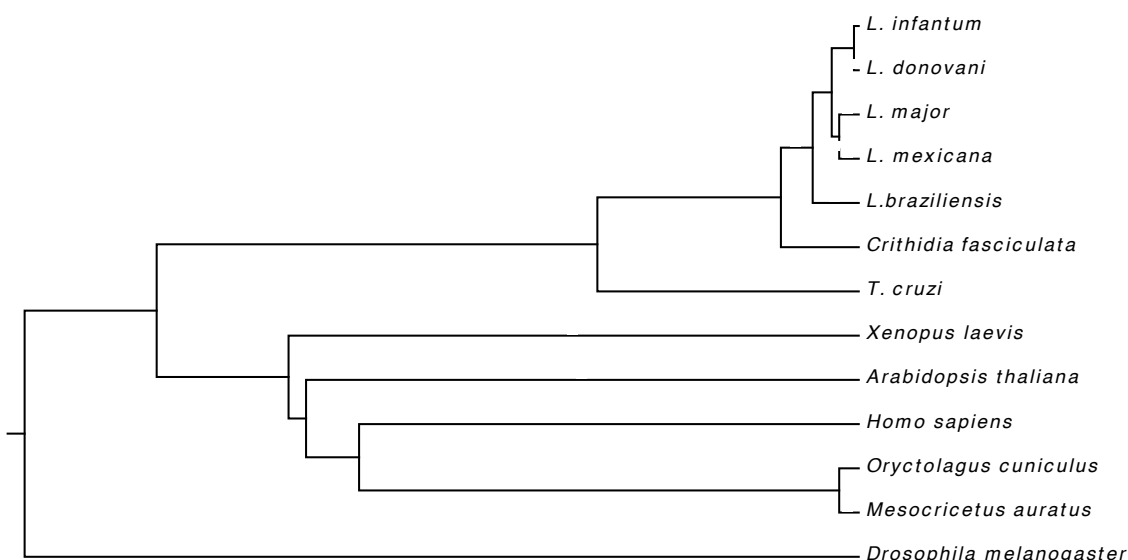
La Figura 13 muestra la comparación de la secuencia de la proteína Ubc1 de *L. infantum*, codificada por el gen LinJ.33.2910, con sus ortólogos eucariotas desde plantas a mamíferos superiores y el hombre, pasando por anfibios y *Drosophila melanogaster*.

L. infantum	1	MPLT	AAGMRTLMRQMQEVEHPVDGVQVRPADSMSEYHFDLDGPEGTPFAAGRHFHVALIF
A. thaliana	1	EPCH	IKKISISILSISLSSSSMASQASLLQKQKDLCKHPVDGFSAGLVDEKNIFEWSV
H. sapiens	1	MSGI	ALSRLAQRKAWRKDHPPGFVAVPTKNPDGTMNLMNWECAIPGKKGTPWEGGLFKL
X. laevis	1	MALK	RIQKELMDLQRPDPAQCSAGPVGEDLFHWQATIMGPNDSPPQGGVFFLTTHFPPTY
O. cuniculus	1	MSTP	ARRRLMRDFKRLQEDPPVGVSGAPSENINIMQWNAVIFGPEGTPFEDGTFFKLIVIEFS
D. melanogaster	1	MTAP	RRLRKELSDLQGNALKSFRDIKADDDNLLRWTGLIVPDNPPYKGAFRIEINFPAE
M. auratus	1	MSTP	ARRRLMRDFKRLQEDPPAGVSGAPSENINILVWNAVIFGPEGTPFEDVYADGSICLD
L. infantum	61	DEQY	PEVPPKGGFFRTKIFHPNISRGDICVNALKRDWAPTLGLRHILVVIRCLLIEPNPE
A. thaliana	61	TIIG	PDPTYEGGFNAIMTFQNYPNSPPTVRFSDMWHPNVYSDGRVCISILHPPGDD
H. sapiens	61	RMLF	KDDYPSSPPKCKFEPLFHPNVYPSGTVCLSILEEDKDWPAITIKQILLGIQELL
X. laevis	61	PFKP	QKVAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSPALTVSKVLLSICSLCDPNPDDPLV
O. cuniculus	61	EYYP	NKPPTVRFLSKMFHPNVYADGSICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLEPNPNS
D. melanogaster	61	YPFK	QPKINFKTRIYHPNIDEKQVCLPIISTENWKPATRTDQVVQALVDLINDPEPEHP
M. auratus	61	ILQN	RWSPTYDVSSILTSIQSLLEPNPNSPANSQAAQLYQENKREYKRVSAIVEQSWR
L. infantum	121	SALNEE	AGRLILEEYAAERKAAMYTITINAARPNGVPRFTLPEVQAEKASSLVTADASAP
A. thaliana	121	PSGY	ELASERWTPVHTVESIMLSIISMLSGPNDESPANVEAAKEWRDKRDEFKKKVSRCV
H. sapiens	121	NEPNI	QDPAQAEAYTIYQNRVEYEKRVRAQAKKFAPS-----
X. laevis	121	PEIA	HTYKADREKYNRRLAREWQKYAM-----
O. cuniculus	121	PANS	QAAQLYQENKREYKRVSAIVEQSWNDS-----
D. melanogaster	121	LRAE	LAEEFLKDRKKFVKNAEDYTKKHSEKRPAD-----
M. auratus	121	DC	-----
L. infantum	181	VAGES	GASSTTAAASASSMANGSTPSTATRRLTLSEANCHPGAATAAEKAEKSKKKALRR
A. thaliana	181	RKSQ	EMF-----
H. sapiens			-----
X. laevis			-----
O. cuniculus			-----
D. melanogaster			-----
M. auratus			-----
L. infantum	241	I	
A. thaliana		-	
H. sapiens		-	
X. laevis		-	
O. cuniculus		-	
D. melanogaster		-	
M. auratus		-	

**Figura 13. Alineamiento comparativo de la estructura primaria de la proteína LiUbc1 en algunos eucariotas.** La figura representa en una escala de grises en más oscuro los residuos más conservados. Se observa un descenso muy notable de la homología, conforme a que los organismos están más separados en la escala evolutiva.



**Figura 14. Alineamiento comparativo de la estructura primaria de la proteína LiUbc1.** Se representa en escala de grises el grado de conservación tanto en especies de la familia de los tripanosomátidos como de distintos eucariotas.



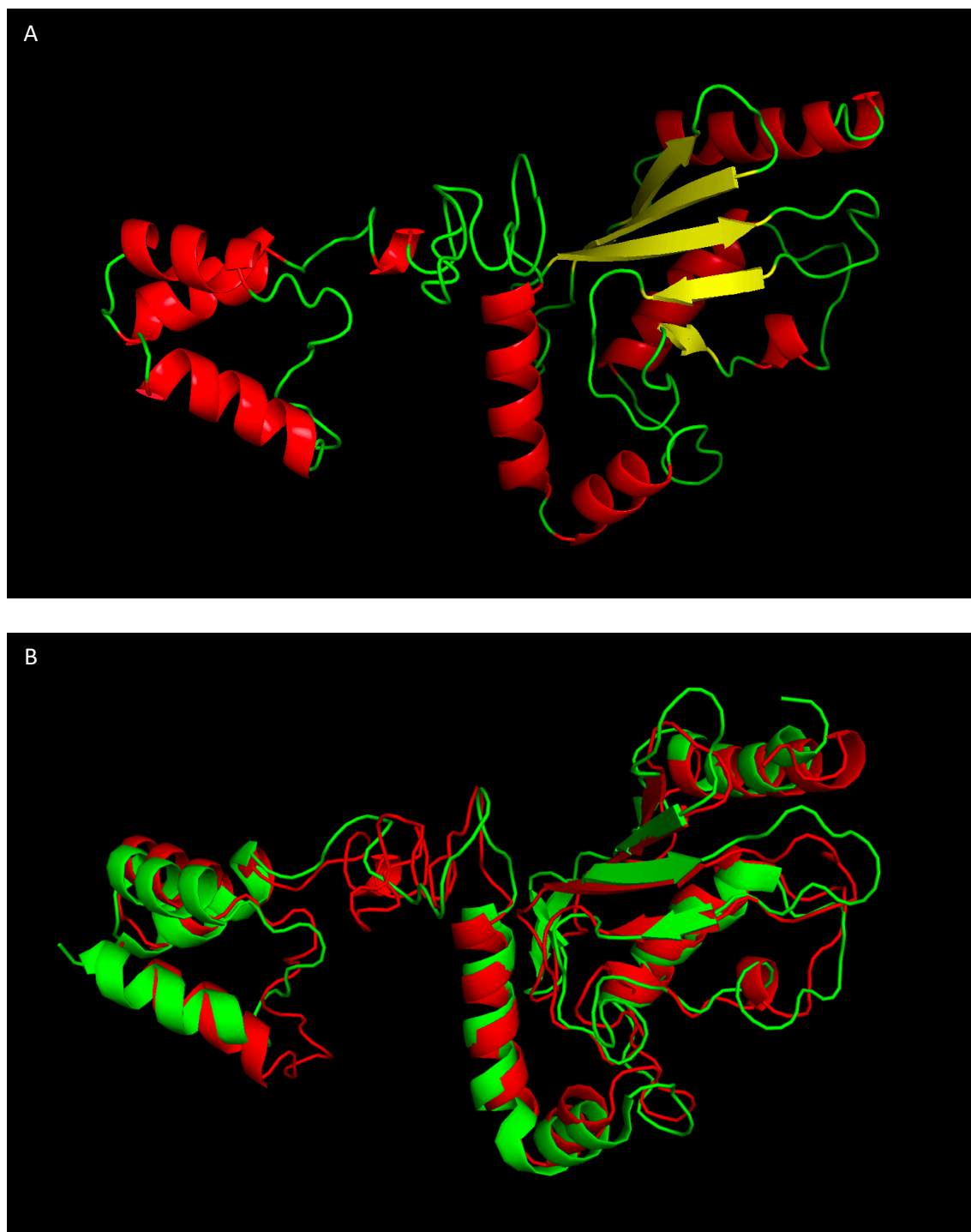
**Figura 15. Análisis filogenético de la proteína LiUbc1.** El árbol filogenético con distintas especies tanto de la familia de los tripanosomátidos como con distintas proteínas homólogas. Las especies de la familia de los tripanosomatidos están evolutivamente próximas mientras que según vamos comparando con ortólogos de mamíferos se aleja evolutivamente.

El árbol filogenético de la secuencia de la proteína Ubc1 de las distintas especies del género *Trypanosoma* y de sus proteínas homólogas, muestra que la proteína permanece bastante conservada evolutivamente, con unos valores de homología entre el 99% y el 80%, en la familia de los tripanosomátidos, mientras que se aleja en el caso de sus ortólogos de otros taxones. Cabe destacar que el ortólogo de *Drosophila melanogaster* es el más divergente como se ha visto en los porcentajes de homología (27%).

De todos los datos expuestos, cabe deducir que una proteína de modificación post-traducciona l y regulación como la LiUbc1, que está presente a lo largo de toda la escala evolutiva, muestra diferencias notables en su secuencia con sus proteínas ortólogas. En el caso de los protozoos del género *Leishmania*, un eucariota primitivo, muestra diferencias entre especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Estas diferencias se hacen todavía más destacadas en el caso de especies del género *Trypanosoma*, dentro de la misma familia de tripanosomátidos, los valores disminuyen conforme se asciende en la escala evolutiva, desde las plantas a los anfibios hasta llegar al hombre. Es interesante el alejamiento evolutivo de la proteína en *Drosophila melanogaster*, mayor incluso que con el hombre. Estas diferencias estructurales, no obstante, probablemente no afecten a la función de estas proteínas que parece mantenerse a lo largo de la escala evolutiva, lo cual representa una adaptación biológica interesante para cubrir una necesidad funcional. Todas estas diferencias suponen que la proteína LiUbc1, cumple uno de los requerimientos para que pueda considerarse candidato a vacuna o a una posible diana terapéutica, deben mostrar una estructura diferente a su homóloga de la especie hospedadora del parásito.

#### 4.2 MODELADO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA LiUbc1

Con objeto de predecir la estructura de la proteína LiUbc1, se ha realizado un modelado molecular basado en un ortólogo con elevada homología, cuya estructura tridimensional está resuelta. Se usaron distintos programas para obtener el modelado y concretamente, se utilizaron las bases de datos del *Protein Data Bank*, y se compararon con estructuras de dicha base de datos de *Homo sapiens* (Sheng, Hong et al. 2012) y *Saccharomyces cerevisiae* (Merkley and Shaw 2004), la cual forma un homodímero, por lo que LiUbc1 posiblemente también lo forme. Esta predicción se ha confirmado, como se verá más adelante, mediante los datos obtenidos durante la purificación de dicha proteína.



**Figura 16. Modelado molecular de LiUbc1.** Este modelado fue obtenido con los programas *CPHmodels* v3.2, *i-Tasser* y *PyMol*. **A.** En la imagen A se ve el modelado de la proteína LiUbc1. **B.** Alineamiento del modelo predicho utilizando *i-Tasser* frente a la proteína Ubc1 de *Saccharomyces cerevisiae* (1TTE). En rojo aparecen hélices  $\alpha$ , en amarillo láminas  $\beta$  y en verde *random coil*.



**Figura 17. Modelado molecular de LiUbc1.** Este modelado fue obtenido con los programas *CPHmodels* v3.2, *i-Tasser* y *PyMol*. **A.** En la imagen B se observa el modelado de la proteína Ubc1 de *H. sapiens*. **B.** Alineamiento del modelo predicho por *i-Tasser* frente a la proteína conjugadora de la ubiquitina de *Homo sapiens* (1ZDN). En rojo aparecen hélices  $\alpha$ , en amarillo láminas  $\beta$  y en verde *random coil*. El modelado molecular se basa en la proteína conjugadora de la ubiquitina de *H. Sapiens* (1ZDN).

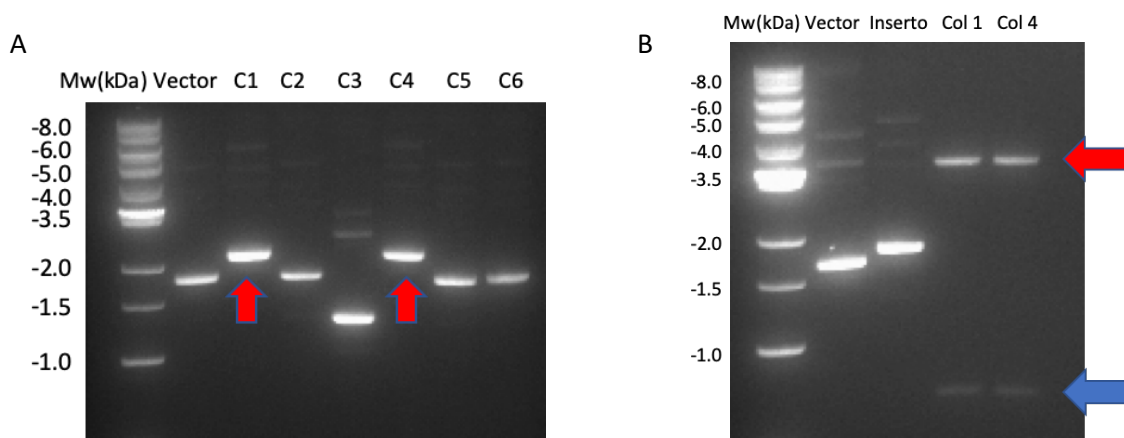
Las predicciones se han obtenido con varios *software*, aunque finalmente se han utilizado los programas *PyMol* e *i-Tasser*. El resultado más destacable, más allá de la descripción de la estructura es que se trata de un homodímero (Merkley and Shaw 2004). La estructura se asemeja bastante a la obtenida con otro eucariota primitivo, la levadura *Saccharomyces*

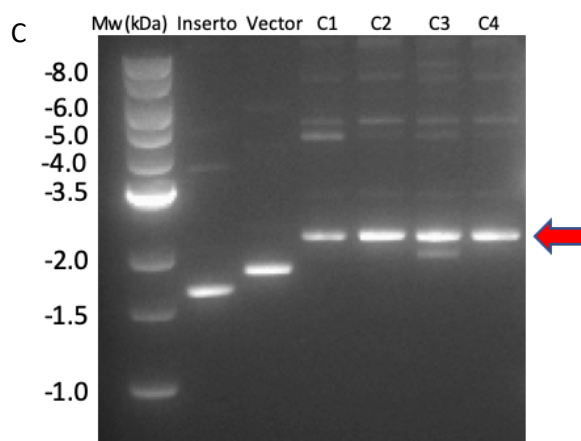
*cerevisiae* (ver Figura 16B) y que estas semejanzas están menos presentes en el caso de *H. sapiens* donde el dominio C-Terminal no está presente (Figura 17B). El dominio N-terminal es el conservado. La predicción de la formación de dímeros se ha confirmado a lo largo del trabajo realizado como se mostrará más adelante en la presente tesis doctoral. Así mismo, los datos de la predicción de la estructura de la proteína LiUbc1 mediante modelado molecular confirman los de la estructura primaria en cuanto al alejamiento estructural de estas proteínas de eucariotas primitivos, no solo los de los protozoos del género *Leishmania*, sino también los de la levadura *S. cerevisiae* con los de los mamíferos superiores, fundamentalmente con *H. sapiens* (Figura 17B).

### 4.3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA LiUbc1 RECOMBINANTE Y GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL

#### 4.3.1. Clonaje del gen LinJ.33.2910 de *L. infantum*.

En primer lugar, se llevó a cabo el clonaje del gen LinJ.33.2910 en el vector de expresión pQE-30. El proceso aparece reflejado en la Figura 18A en la que se muestra tanto el inserto correspondiente a la secuencia del gen LiUbc1, como el vector plasmídico de expresión. Una vez comprobado el correcto ensamblaje del inserto, la construcción se obtuvo mediante la transformación correspondiente. Dicha construcción se llevó a cabo en la cepa XL1-Blue de *E. coli* y posteriormente se transformó la cepa M15 de *E. coli* para la expresión de la proteína recombinante en sistema heterólogo (Figura 18C).



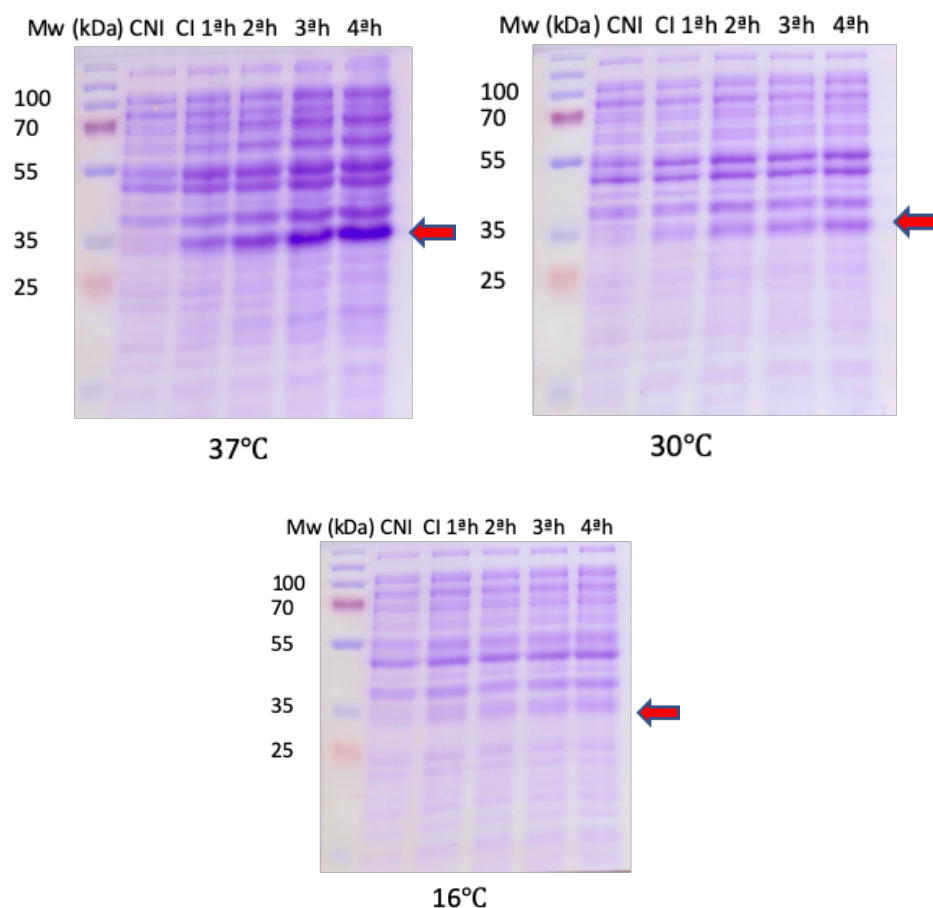


**Figura 18. Clonaje de la proteína conjugadora de la Ubiquitina E2 (Linj.33.2910)** Abreviaturas: C, clones obtenidos. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las *miniprep* obtenidas de la transformación de la construcción Ubc1-pQE-30 en la cepa XL1 Blue de *E. coli*. Marcadas con flechas rojas las posibles colonias positivas. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de comprobación del clonaje mediante digestión doble con BamHI y HindIII. Podemos ver el inserto (flecha azul) y el vector pQE-30 (flecha roja). **C.** Electroforesis de la transformación en la cepa *E. coli* M15 para la expresión del gen *LiUbc1*. Las flechas en rojo indican el tamaño estimado de la construcción.

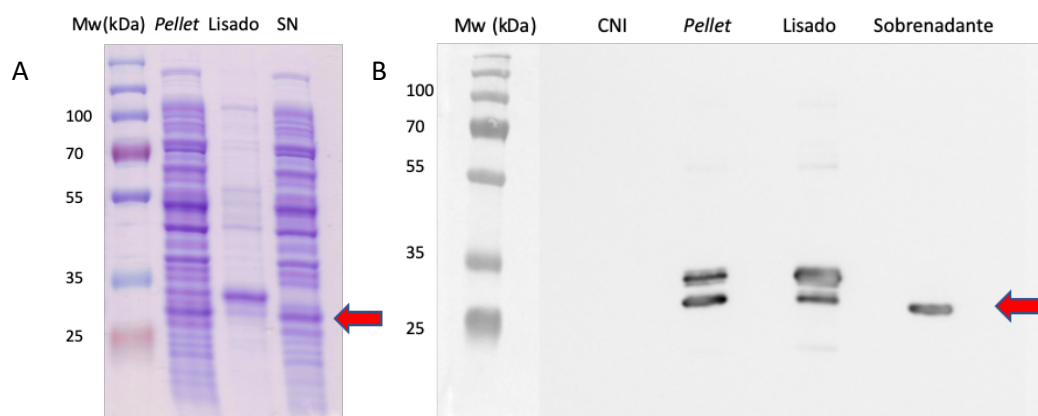
#### 4.3.2. Expresión en sistema heterólogo, purificación de la proteína LiUbc1 en condiciones desnaturizantes y generación de un anticuerpo policlonal.

Para la expresión de la proteína se ensayaron tres temperaturas (16°C, 30°C y 37°C) y a una concentración 1mM de IPTG. Se observó que la temperatura óptima de inducción fue de 37°C (Figura 19). Una vez realizadas estas pruebas, se procedió a la evaluación de la solubilidad (Figura 20) de la proteína recombinante, para lo que se utilizó el kit *Bugbuster*® (ver Materiales y Métodos). Según las pruebas realizadas, resultó que en principio se trataba de una proteína parcialmente soluble. Se ensayaron diferentes condiciones experimentales para la purificación de la proteína soluble sin éxito por lo que se optó por purificarla en condiciones desnaturizantes mediante cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup>.



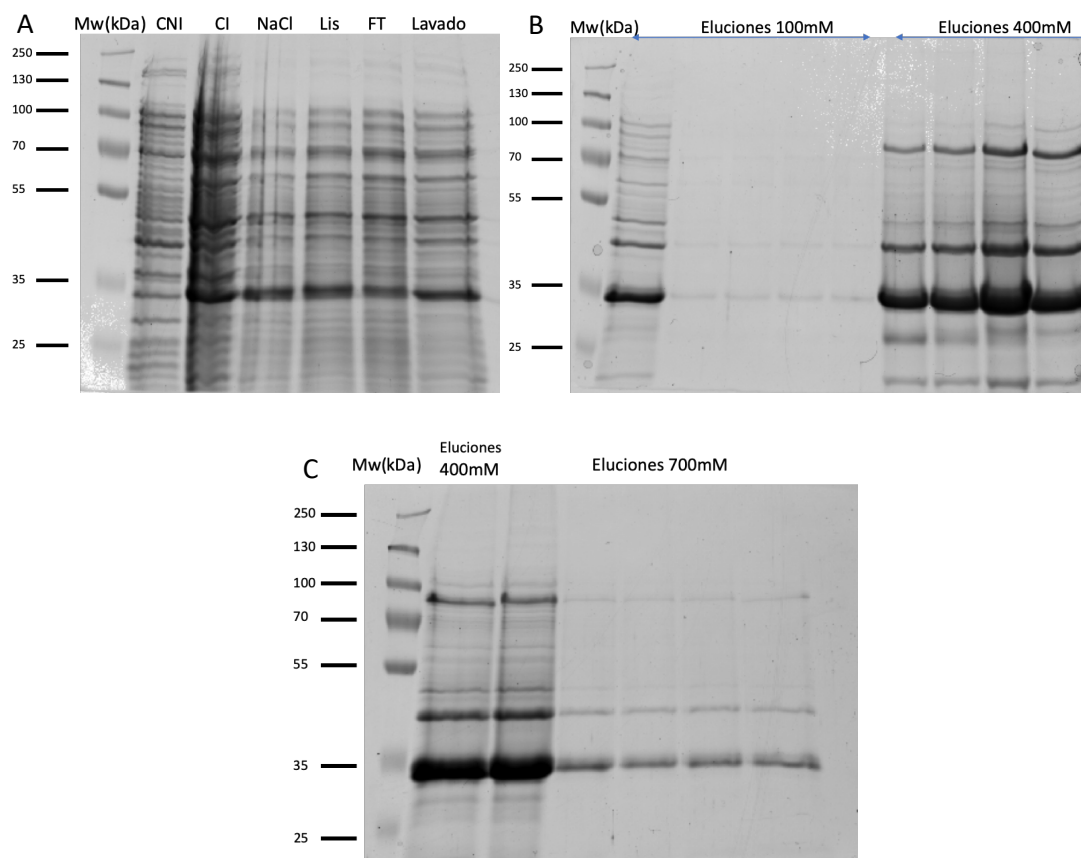


**Figura 19. Condiciones de inducción de la proteína LiUbc1 en sistema heterólogo.** Electroforesis SDS-PAGE al 10% del control no inducido (CNI) y de los controles de inducción LiUbc1 a 37°C, 30°C y 16°C. Se tomó una muestra cada hora. En todos los casos se utilizó una concentración de IPTG 1 mM para la inducción de la expresión proteica. La flecha roja muestra el tamaño donde debe aparecer la proteína (33 kDa).



**Figura 20 Solubilidad de la proteína LiUbc1.** **A.** Patrón de solubilidad de la proteína LiUbc1. 10% SDS-PAGE. Abreviaturas: *Pellet* (fracción insoluble); *Lisado* total; *SN* (fracción soluble). La flecha roja indica el tamaño de LiUbc1 (33 kDa). Para estudiar la solubilidad se utilizó el *BugBuster*®. **B.** *Western Blot*. Abreviaturas: (CNI) Control no inducido; *Pellet* (fracción insoluble); *Lisado*: lisado total; *sobrenadante*

(fracción soluble). Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-6xhistidina a una dilución 1:5000 y un anticuerpo secundario cabra anti-igG de ratón conjugado con HRP, a 1:1000.

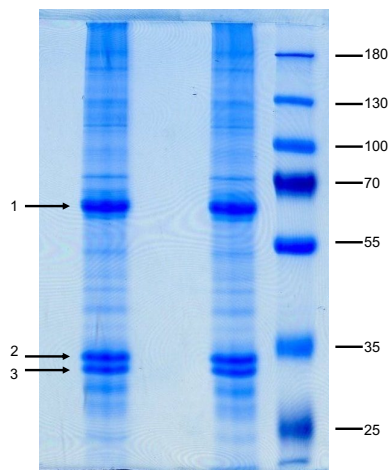


**Figura 21. Purificación de la proteína LiUbc1 utilizando columnas de Ni-NTA agarosa en condiciones desnaturizantes.** Electroforesis SDS-PAGE al 10% de los extractos obtenidos en la purificación de la proteína LiUbc1. **A.** CNI: Control no inducido; CI: Control inducido; NaCl: lavado con NaCl; Lis: Lisado; FT: *Flowtrouth*; Lavado: Lavado con solución de imidazol a 50mM. **B y C.** Eluciones con distintas concentraciones de imidazol, 100mM, 400mM y 700mM en orden creciente.

Para llevar a cabo la purificación, se utilizaron columnas de Ni-NTA agarosa para la unión específica de las seis histidinas incorporadas a la proteína LiUbc1 recombinante, a una concentración de 50mM de imidazol para la unión. Como puede verse en la Figura 21, se obtiene una banda purificada de la proteína en el tamaño molecular de 33kDa cuando se eluyó en discontinuo a 100mM, 400mM y 700mM de imidazol. Se usaron los eluatos obtenidos a 400mM de imidazol. Posteriormente se concentró la proteína LiUbc1 utilizando un filtro para centrífuga *Amicon*® 30kDa. La proteína purificada se inoculó en dos conejos para la obtención de un anticuerpo policlonal frente a la proteína LiUbc1.

#### 4.3.3. Identificación de LiUbc1 mediante espectrometría de masas LC-MS.

Se extrajeron las bandas correspondientes al peso molecular de 70kDa y a las bandas del rango 30-33 kDa (Figura 22) que se analizaron mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas LC-MS para su identificación. Los resultados pueden verse en la Tabla 6 y corresponden a LiUbc1, por lo que se confirma que se encuentra también en forma de homodímero como se ha descrito (Merkley and Shaw 2004). Así mismo, elimina la posibilidad de que las bandas de 70 kDa y las intermedias resultaran ser contaminantes.



**Figura 22** Patrón electroforético de las bandas analizadas por espectrometría de masas LC-MS. Se analizó por espectrometría de masas las bandas resultantes a una altura entorno a 70kDa y alrededor de 35kDa para verificar los datos del Western Blot.

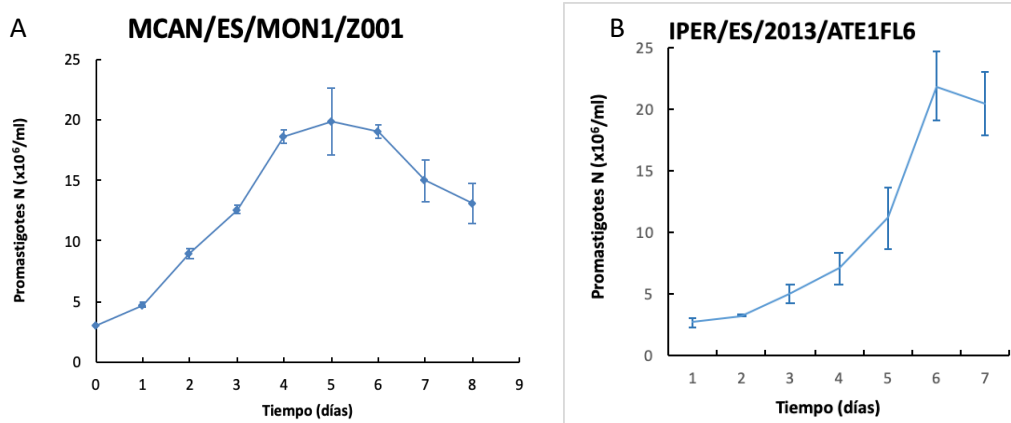
**Tabla 6.** Identificación mediante espectrometría de masas LC-MS. Se obtuvieron los siguientes resultados de las bandas 1, 2 y 3 (Figura 22). Como se puede ver, todas pertenecen a la proteína Ubc1 de *Leishmania infantum*. El MASCOT score es un parámetro estadístico que indica que la identificación es fiable ( $p < 0,05$ ) si es superior a 52. La cobertura es el porcentaje de la secuencia de la proteína que ha sido identificada.

Muestra	Gen	Descripción	Score	Coverage (%)
1	LinJ.33.2910	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>	1235	91,70
2	LinJ.33.2910	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>	486,88	70,54
3	LinJ.33.2910	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>	223	45,64

#### 4.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LiUbc1 DURANTE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE PROMASTIGOTES DE LOS AISLADOS MCAN/ES/MON1/Z001 Y IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE *L. INFANTUM* EN CULTIVO AXÉNICO.

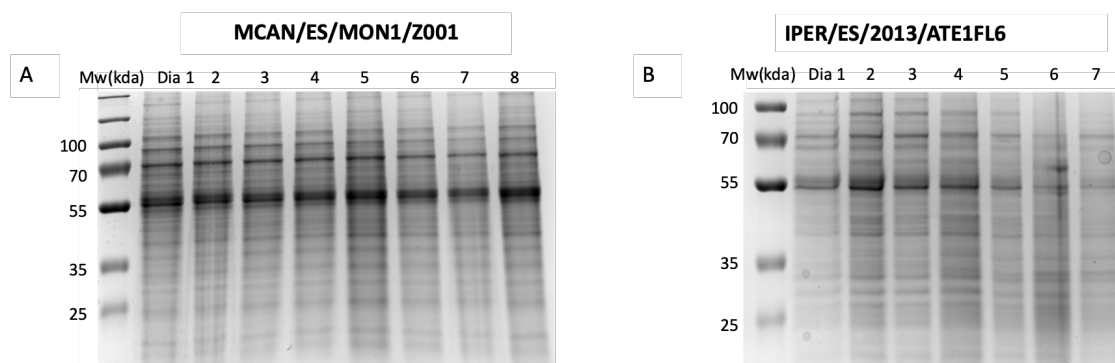
Los estudios de expresión de la proteína LiUbc1 se llevaron a cabo en dos cepas distintas de *L. infantum*. El aislado MCAN/ES/MON1/Z001 procedente de un perro con infección natural (Labrador) y el aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 que se obtuvo del reciente brote infeccioso en la localidad de Fuenlabrada (Madrid) y en el que se describió que el reservorio fue la liebre en lugar de la población de perros (Jiménez, Gonzalez et al. 2013). Ambos aislados se establecieron en cultivo axénico, y la cinética de crecimiento, así como la caracterización de los niveles de LiUbc1 y localización se llevaron a cabo posteriormente.

La Figura 23 muestra las diferencias en la curva de crecimiento entre las dos cepas consideradas. El aislado procedente de la infección natural de un perro muestra un patrón habitual en los cultivos axénicos, con una fase logarítmica seguida de un *plateau* a partir del día 4 y un descenso a partir del día 7 de cultivo (Figura 23). La cepa responsable del brote en humanos obtenida de una colonia de flebotomos muestra un patrón de crecimiento diferente con una fase logarítmica más prolongada y un crecimiento de multiplicación más tardío alcanzándose el máximo crecimiento el día 6 y comenzando rápidamente la fase de muerte.



**Figura 23 Curvas de crecimiento de promastigotes en cultivo axénico.** Se mantuvieron los cultivos a 27°C en medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado a 56°C y antibióticos penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Se extrajeron muestras de proteína total. Tras alcanzar el cultivo la fase estacionaria, se aislaron los promastigotes más infectivos (PNA-) y también los menos (PNA+), mediante selección negativa con lectina de cacahuete (PNA) **A.** Curva de crecimiento de *L. infantum* del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 del hospedador mamífero perro. **B.** Curva de crecimiento de *L. infantum* procedente del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6.

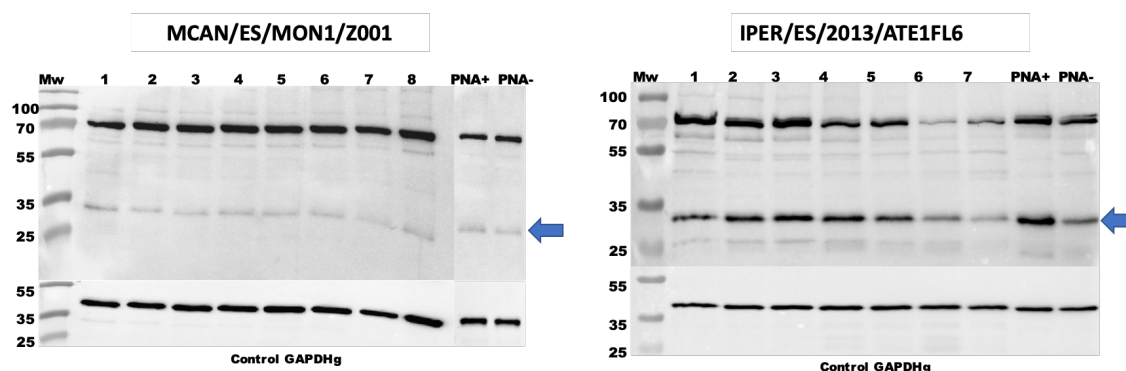
Dadas las diferencias del patrón de crecimiento en el cultivo axénico de estos dos aislados, se compararon los niveles de expresión de la proteína LiUbc1 en los promastigotes a lo largo de los días considerados. La Figura 24 muestra mediante la tinción de Coomassie el patrón de la expresión total de proteína a lo largo de los diferentes días de cultivo. Como puede verse, los patrones de expresión son diferentes. El parásito procedente de un animal con infección natural muestra una expresión constante a lo largo de toda la curva de crecimiento en las fases logarítmica y estacionaria. En los parásitos correspondiente a la infección humana el patrón de expresión muestra un patrón menos homogéneo.



**Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos totales de la curva de crecimiento de los promastigotes.** Los extractos fueron cuantificados por el método *Bradford* y se realizó la lectura de la absorbancia a 595nm en un lector de placas *Varioskan™*. Se cargaron 50 µg de proteína en cada calle. **A.** *Coomassie* de los extractos totales de proteína a lo largo de la curva de crecimiento de *L. infantum* del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 del hospedador mamífero perro. **B.** *Coomassie* de los extractos totales de proteína a lo largo de la curva de crecimiento de *L. infantum* procedente del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6.

Con objeto de determinar los niveles relativos de la expresión de la proteína LiUbc1 a lo largo del crecimiento y diferenciación en las dos cepas estudiadas, se llevaron a cabo ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo policlonal específico de conejo anti-LiUbc1. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 25. En primer lugar, se observa una banda tenue a 35KDa correspondiente a LiUbc1, que se mantiene constante en el caso del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 y que también aparece en las poblaciones PNA+ y PNA- (del cultivo en fase estacionaria y siendo las últimas más infectivas). Hay que resaltar la presencia de una banda más intensa aproximadamente a los 70 kDa (Figura 25) lo que sugiere la existencia de un homodímero como se ha descrito (Merkley and Shaw 2004). Además, aparecen unas bandas más débiles con un peso molecular intermedio que también son reconocidas por el anticuerpo. Estas bandas podrían corresponder a productos de degradación de la proteína. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-GAPDH glicosomal como control interno y se comprobó que se analizaron cantidades similares de todos los extractos proteicos totales. En el caso del aislado

IPER/ES/2013/ATE1FL6 el patrón es algo diferente. La banda de 35KDa es más intensa que en los promastigotes procedentes del aislado MCAN/ES/MON1/Z001, no permanece constante y reproduce el patrón que se había observado en la Figura 24 con una expresión menor en la fase estacionaria de crecimiento en los días sexto y séptimo. En el caso de los promastigotes PNA+, menos infectivos, la intensidad de la banda del monómero es similar a la del dímero, mientras que en los PNA-, más infectivos, predomina la forma de dímero sobre el monómero.



**Figura 25. Análisis de la abundancia de la proteína LiUbc1 en extractos proteicos totales de ambas cepas mediante Western Blot.** El anticuerpo primario anti-proteína LiUbc1 se empleó a una dilución 1:100 y como secundario un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP a una dilución 1:2000. Se empleó como control de carga interno la proteína GAPDH, utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-GAPDHg (1:10000) y como secundario un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado HRP (1:2000). **A.** Curva de crecimiento de *L. infantum* del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 donde se ve una expresión uniforme a lo largo de los diferentes días en la curva de crecimiento. **B.** Curva de crecimiento de *L. infantum* del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6. Se aprecian diferencias de expresión de la proteína a días 6 y 7.

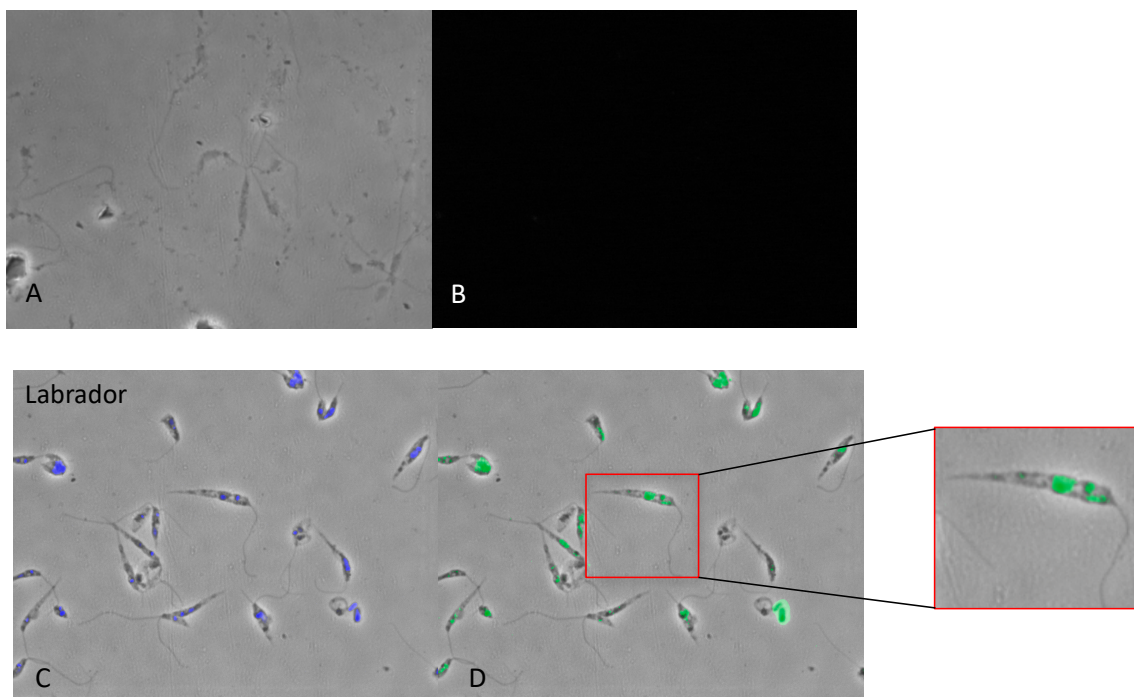
En conjunto los resultados sugieren que la proteína se encuentra en un equilibrio entre monómeros y dímeros con un predominio de los dímeros sobre los monómeros en la cepa MCAN/ES/MON1/Z001, mientras que en el aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 existe un equilibrio mayor entre las bandas del monómero y del dímero. También se muestra que en la fase estacionaria del cultivo los niveles de LiUbc1 son menores. Los promastigotes PNA+ y PNA- muestran alguna diferencia en la relación entre las cantidades de monómero y dímero, pero no se pueden extraer conclusiones precisas porque la técnica de WB no es cuantitativa y se trabaja en condiciones desnaturalizantes si bien éstas no impiden la agregación. Se puede sugerir, no obstante, una presencia mayor de la forma monómero en la cepa más infectiva. Así como una mayor labilidad por la presencia de bandas intermedias que sugieren mayor sensibilidad a la degradación o fenómenos de *trans-splicing* alternativo, según se observó en análisis de RNA-seq (Alcolea, Alonso et al. 2018). En conjunto, las variaciones observadas en el aislado

IPER/ES/2013/ATE1FL6 sugieren una implicación de la proteína LiUbc1 en los fenómenos de regulación en la cepa de elevada infectividad y sugiere su implicación en la misma, por lo que se llevaron a cabo más experimentos en ese sentido (ver más adelante). Cabría pensar que el aislamiento directo del flebotomo podría ser la causa de estas modificaciones en los niveles de la proteína. No obstante, en nuestro laboratorio se han estudiado los promastigotes procedentes de cultivo con los procedentes del medio natural y no se observó este tipo de variaciones (Alcolea, Alonso et al. 2019).

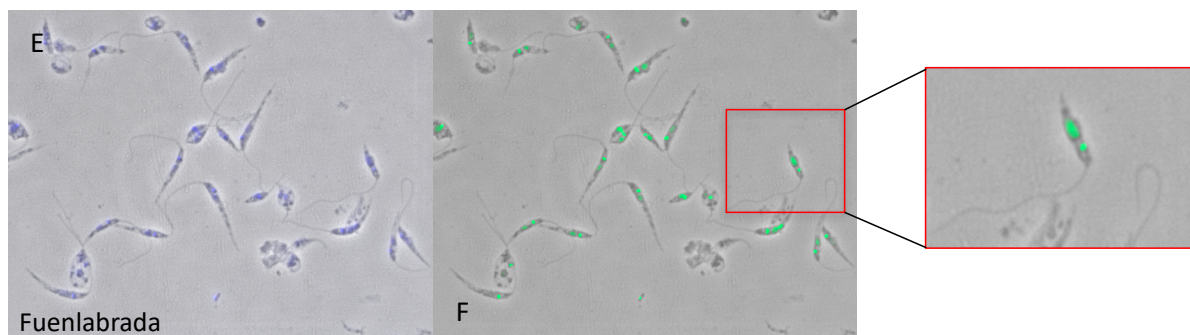
#### 4.5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LiUbc1 EN PROMASTIGOTES DE LOS AISLADOS MCAN/ES/MON1/Z001 Y IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE *L. INFANTUM* EN CULTIVO AXÉNICO.

##### 4.5.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Los estudios de localización de la proteína LiUbc1 se llevaron a cabo mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo específico anti-LiUbc1. La Figura 26 muestra que tanto en la cepa MCAN/ES/MON1/Z001 como la IPER/ES/2013/ATE1FL6, la proteína se encuentra en forma particulada en el parásito con dos localizaciones. Una en el núcleo o sus cercanías y otra en un corpúsculo cercano a la base del flagelo, probablemente el kinetoplasto y/o en las cercanías del bolsillo flagelar.





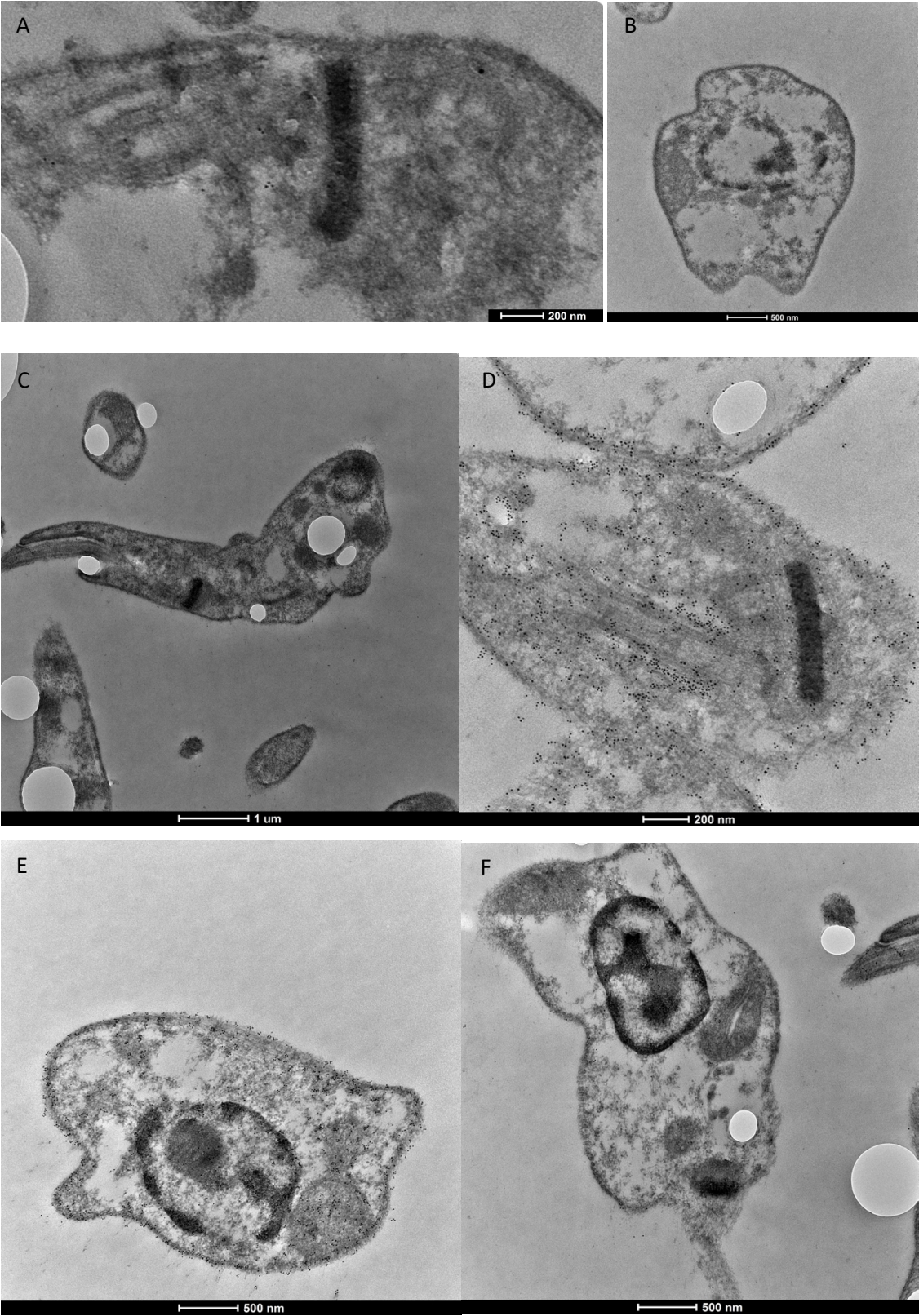


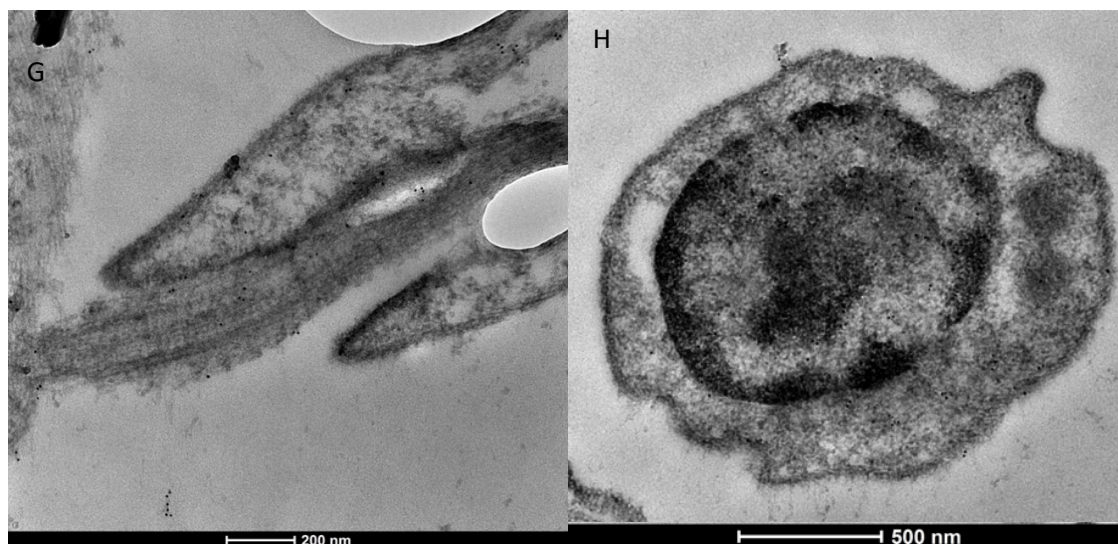
**Figura 26. Localización subcelular mediante inmunofluorescencia indirecta de la proteína LiUbc1.** A. Imagen de contraste de fase. B. Inmunofluorescencia con suero preinmune. C. Imagen de fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto (DAPI) del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 (Labrador). D. Imagen de fluorescencia con suero anti-LiUbc1 conjugado con Alexa 488 (verde) del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 (Labrador). E. Imagen de fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto (DAPI) del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 (Fuenlabrada). F. Imagen de fluorescencia con suero anti-LiUbc1 conjugado con Alexa 488 (verde) del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 (Fuenlabrada). Se puede observar la presencia de la proteína en la zona del núcleo y en el kinetoplasto y bolsillo flagelar. Las preparaciones para la IFI se obtuvieron sedimentando  $2 \times 10^5$  promastigotes en un área circular de  $0,2 \text{ cm}^2$  en un portaobjetos. Se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5%. Se incubaron con el anticuerpo policlonal conejo anti-LiUbc1 a una dilución 1:50 con un anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (1:200) y se añadió de DAPI a  $10 \text{ µg/ml}$ . Para más detalles ver Materiales y Métodos.

#### 4.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los experimentos de localización de la proteína mediante inmunofluorescencia se completaron con estudios de microscopía electrónica gracias a la colaboración de la Dra. Esperanza Pérez Pastrana (Instituto de salud Carlos III). Como puede verse, en la Figura 27, la proteína se encuentra localizada en el bolsillo flagelar y el kinetoplasto del parásito y en la periferia del núcleo, en la membrana nuclear. Dos zonas en las que la actividad de regulación de la ubiquitina podría ser elevada. Ambas localizaciones concuerdan con las funciones asignadas a la ubiquitina (ver Discusión Global). En el caso del bolsillo flagelar por la actividad del flagelo que requiere gran cantidad de modificaciones de proteínas y en los alrededores del núcleo, una zona de gran actividad de regulación. La regulación de la expresión génica en *Leishmania* ocurre casi exclusivamente a nivel post-transcripcional y se da fundamentalmente en cuanto los mRNA maduros alcanzan la membrana nuclear (Clayton and Shapira 2007).







**Figura 27. Localización subcelular mediante microscopía electrónica de la proteína LiUbc1. A. y B.** Control negativo (suero preinmune). Localización celular del bolsillo flagelar, kinetoplasto y núcleo celular. **C. y B.** Control positivo. Se empleó un anticuerpo policlonal de conejo frente a *L. infantum*, donde se pueden observar el bolsillo flagelar, el kinetoplasto y el núcleo, así como el resto de la célula marcados. **E y F.** Marcaje con anticuerpo específico de conejo anti-LiUbc1 marcado con oro coloidal. Detalle del núcleo celular y kinetoplasto. **G.** Marcaje con anticuerpo específico de conejo anti-LiUbc1 marcado con oro coloidal donde se detalla el bolsillo flagelar **H.** Marcaje con anticuerpo específico de conejo anti-LiUbc1 marcado con oro coloidal. Detalle del nucleo celular.

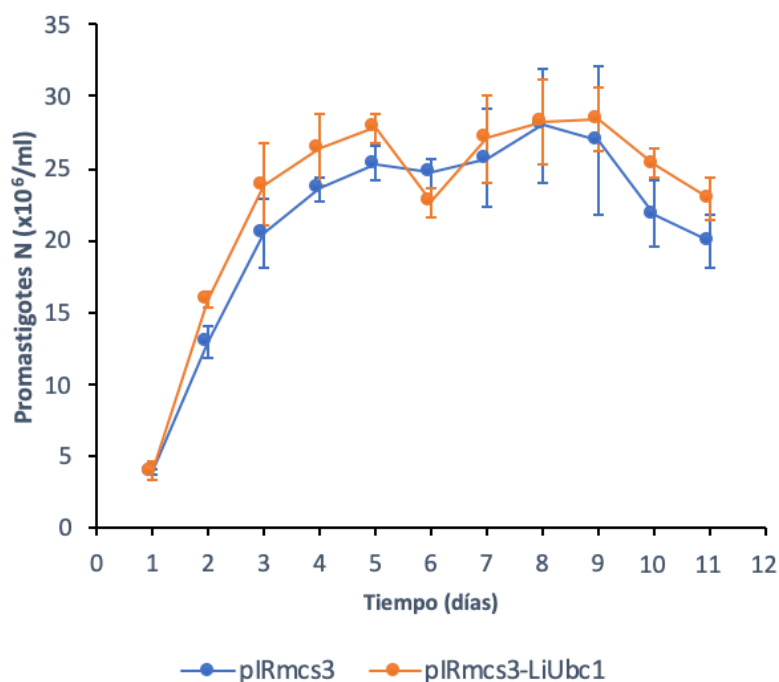
Por tanto, la localización de la proteína LiUbc1, concuerda con su función sugerida a partir de su secuencia de aminoácidos. Y dado que es una proteína de regulación, concuerda con su localización, ya que en los puntos en los que se ha localizado, debería existir un gran número de proteínas reguladoras.

#### 4.6. CARACTERIZACIÓN DE LiUbc1 EN PROMASTIGOTES AXÉNICOS DEL AISLADO IPER/ES/2013/ATE1FL6 DE *L. INFANTUM* MEDIANTE LÍNEAS KNOCK-IN.

##### 4.6.1. Cinética de crecimiento

Dada la dificultad de generar líneas *knock-out* para los estudios funcionales, se optó por la generación de transfectantes *knock-in* que sobre-expresan el gen *LiUbc1*, para comprobar si se producían modificaciones en el comportamiento de los promastigotes. Se utilizó el plásmido pIRmcs3 para la sobre-expresión de genes en tripanosomátidos (Hoyer, Zander et al. 2004). La Figura 28 muestra la cinética de crecimiento de promastigotes de las líneas pIRmcs3 control y pIRmcs3-LiUbc1 del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6. Como puede verse, ambas líneas muestran un patrón de crecimiento diferente a la cepa silvestre (Figura 23B) con un crecimiento mayor en la fase logarítmica, y el comienzo de la fase estacionaria en el día 5. La figura 28, muestra la

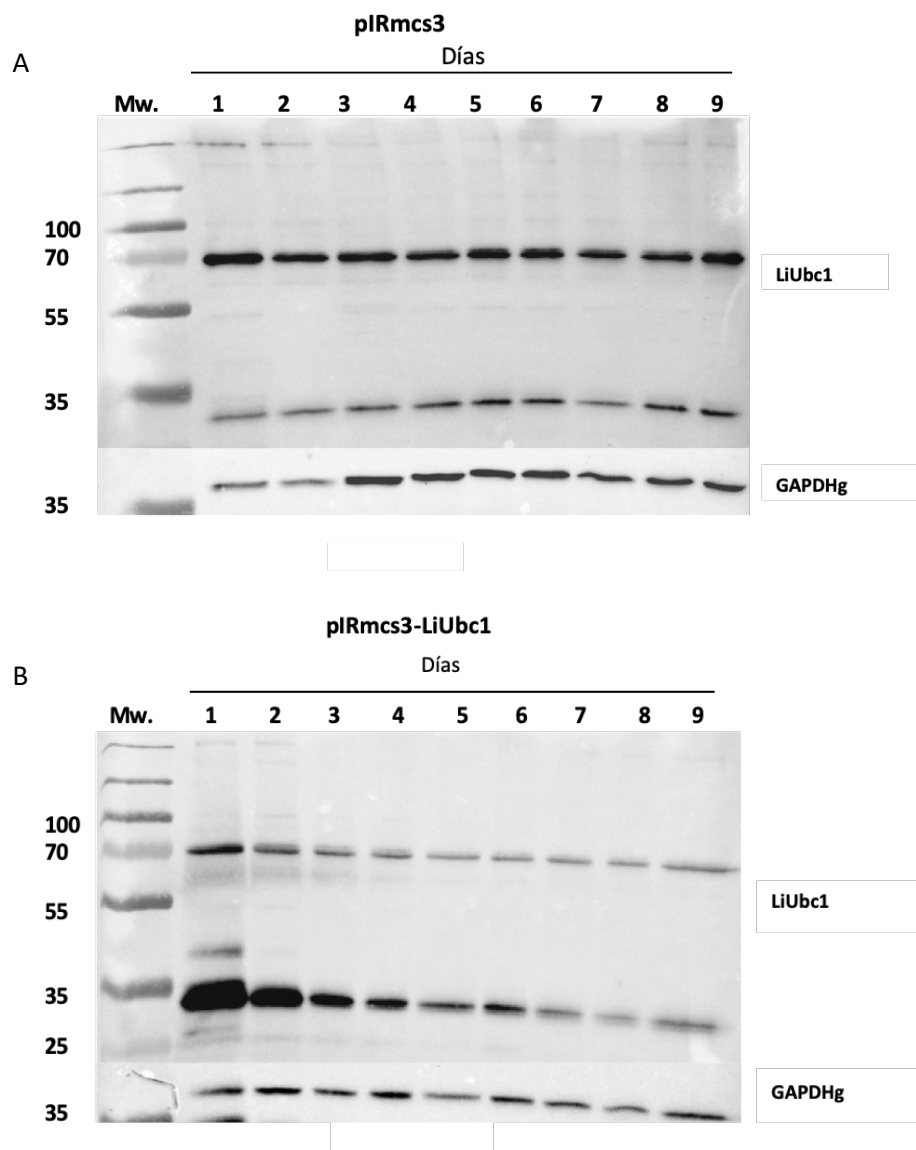
curva de crecimiento en cultivo axénico de los promastigotes transfectados con el gen de la proteína LiUbc1. Como puede verse el patrón de crecimiento es muy similar al del control pIRmcs3 vacío y es diferente del que se muestra en la Figura 23B.



**Figura 28.** Curva de crecimiento de promastigotes transfectados en cultivo axénico de la cepa IPER/ES/2013/ATE1FL6. En azul se muestra el control con plásmido pIRmcs3, y en naranja la línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1.

#### 4.6.2. Niveles de LiUbc1 en promastigotes *knock-in*

La expresión del gen *LiUbc1* en el nivel de abundancia de proteína presenta un patrón similar entre la línea control pIRmcs3 y el aislado silvestre (Figuras 23A y 25). Concretamente, los niveles de LiUbc1 se mantienen aproximadamente constantes, con mayor cantidad de homodímero que de monómero. En conjunto, si se compara con la cepa silvestre muestra un patrón de expresión similar al obtenido en el caso de la cepa MCAN/ES/MON1/Z001 (ver apartado anterior) y distinto de la cepa IPER/ES/2013/ATE1FL6. Los controles internos con GADPHg muestran la homogeneidad de los extractos proteicos.



**Figura 29. Análisis de la abundancia de la proteína LiUbc1 en extractos proteicos totales de la línea *knock-in* del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 mediante Western Blot. A. Línea control pIRmcs3. B. Línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1. Se utilizó el anticuerpo anti-LiUbc1. Como control interno de carga se utilizó un anticuerpo anti-GAPDHg.**

Los niveles de expresión de la proteína LiUbc1 a lo largo de los diferentes días de cultivo en la cepa *knock-in*, se muestran en la Figura 29, y se observa una modificación con respecto a los patrones obtenidos tanto en la cepa silvestre como la cepa control de sobre-expresión. En primer lugar, se observa un incremento en la forma monomérica de la proteína. Esta sobre-expresión es muy importante en la fase logarítmica temprana del cultivo (día 1). Es también muy notable a día 2 y va disminuyendo progresivamente a lo largo de la fase logarítmica y alcanzando los niveles basales en la estacionaria (días 5 y 6). En las fases iniciales también se detectan formas intermedias que podrían ser productos de degradación. Los controles de GAPDHg también muestran la homogeneidad de los niveles de proteína total de la sobre-expresión.



#### 4.6.3 Alteraciones en la abundancia de proteínas causada por la sobreexpresión inducida de *LiUbc1*.

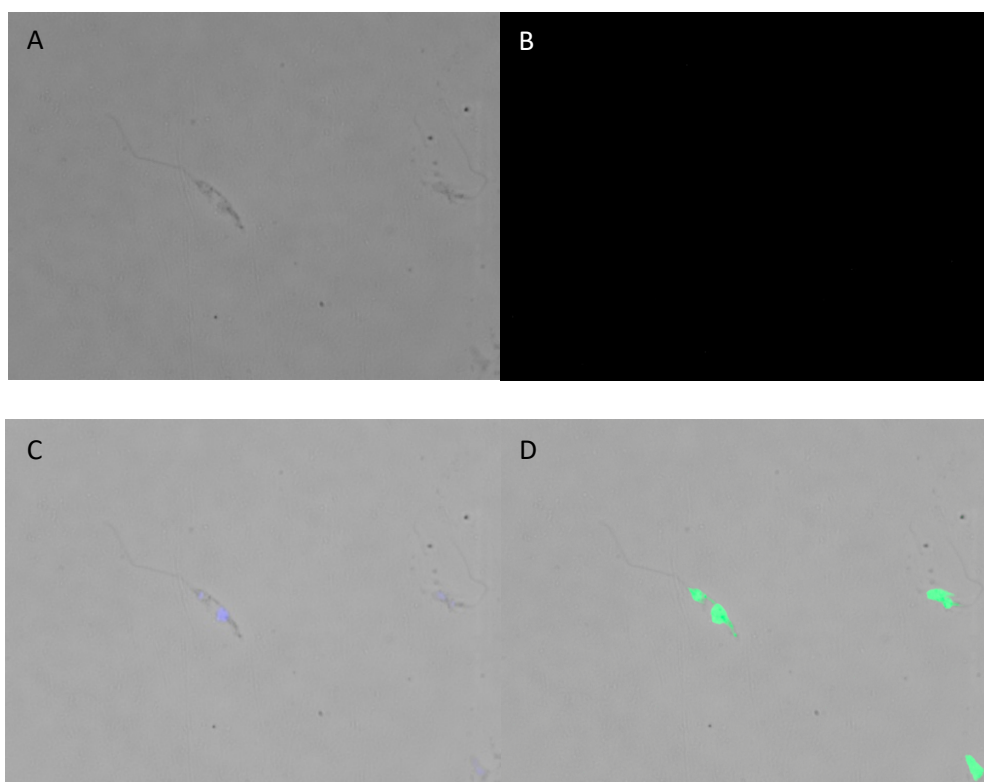
Se ha llevado a cabo un estudio de proteómica cuantitativa mediante análisis con los reactivos iTRAQ comparando la línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 con la línea control pIRmcs3 a días 1, 3 y 5 de la curva de crecimiento (Figura 28). Los datos obtenidos confirman los resultados de *Western blot* donde se observa la sobre-expresión en el día 1 y su descenso progresivo. No se ha observado que la sobre-expresión del gen *LiUbc1* altere los niveles de expresión de ninguna otra proteína. El número total de proteínas detectadas es de 1057, de las cuales, aproximadamente 800 pudieron compararse con los niveles de proteínas en el control.

**Tabla 7. Resultados del análisis por espectrometría de masas LC-MS/MS** Se muestra los niveles de expresión de la proteína LiUbc1 y los de otros genes relacionados con las ubiquitininas de *L. infantum*. El nivel mínimo de abundancia relativa se estableció en una ratio de 2 ( $\text{Log}_2 \text{ratio} \geq 1$ ).

Gen	Descripción	Ratio $\text{Log}_2$								
		pIR-LiUbc1 D1 vs pIRmcs3 D1 R1	pIR-LiUbc1 D1 vs pIRmcs3 D1 R2	Media pIR-LiUbc1 D1 vs pIRmcs3 D1	pIR-LiUbc1 D3 vs pIRmcs3 D3 R1	pIR-LiUbc1 vs pIRmcs3 D3 R2	Media pIR-LiUbc1 vs pIRmcs3 D3	pIR-LiUbc1 D5 vs pIRmcs3 D5 R1	pIR-LiUbc1 D5 vs pIRmcs3 D5 R2	Media pIR-LiUbc1 D5 vs pIRmcs3 D5
LinJ.33.2910	<i>LiUbc1</i>	2,990	2,560	2,759	0,446	0,290	0,031	0,734	0,010	0,327
LinJ.23.0710	<i>ubiquitin-activating enzyme E1, putative</i>	0,079	0,059	0,008	0,112	0,014	0,062	0,306	0,389	0,083
LinJ.35.1310	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative</i>	0,031	0,011	0,021	0,024	0,224	0,095	0,098	0,450	0,264
LinJ.13.1320	<i>ubiquitin-conjugating enzyme, putative</i>	0,429	-0,013	0,225	0,601	0,039	0,317	0,271	0,564	0,087

#### 4.6.4. Localización subcelular de LiUbc1 en promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6 de *L. Infantum* en cultivo axénico.

El patrón de Inmunofluorescencia en la línea *knock-in* LiUbc1 (Figura 31) es similar al obtenido en el aislado silvestre (Figura 26), solo muestra una mayor intensidad en las zonas del núcleo y kinetoplasto y/o bolsillo flagelar.



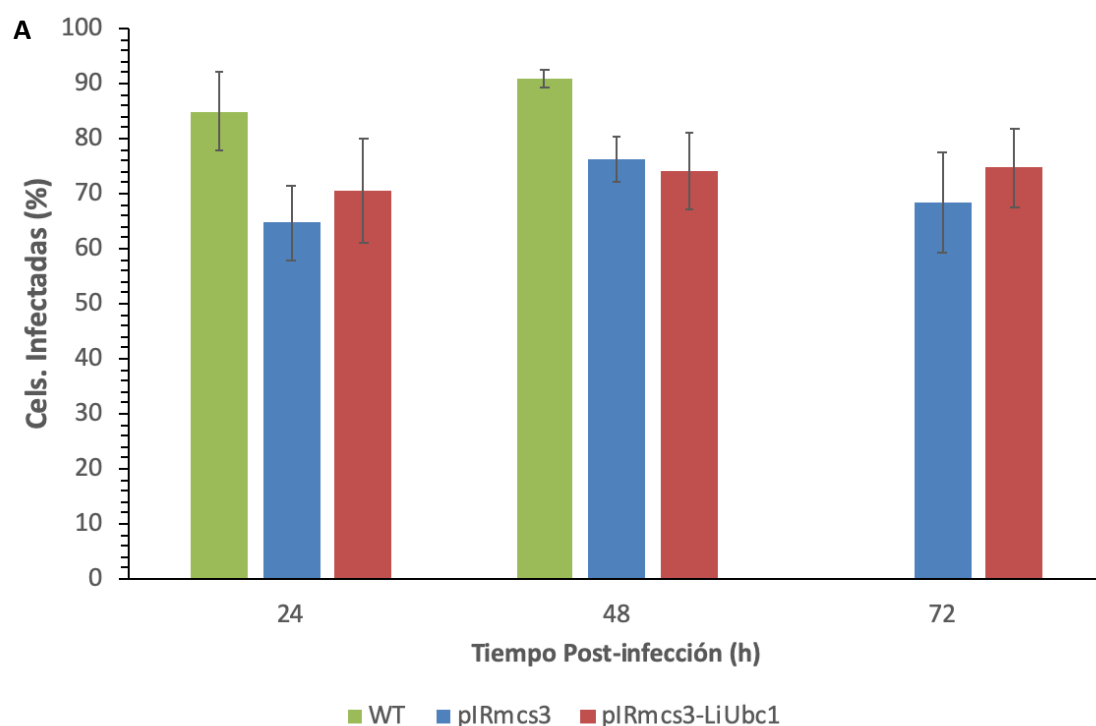
**Figura 31. Localización subcelular mediante inmunofluorescencia indirecta de la proteína LiUbc1 en promastigotes *knock-in* del aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6. A.** Imagen de contraste de fase. **B.** Inmunofluorescencia con suero preinmune. **C.** Imagen de fluorescencia en azul del núcleo y kinetoplasto. (DAPI) **D.** Imagen de fluorescencia con suero anti-LiUbc1 conjugado con Alexa 488 (verde).

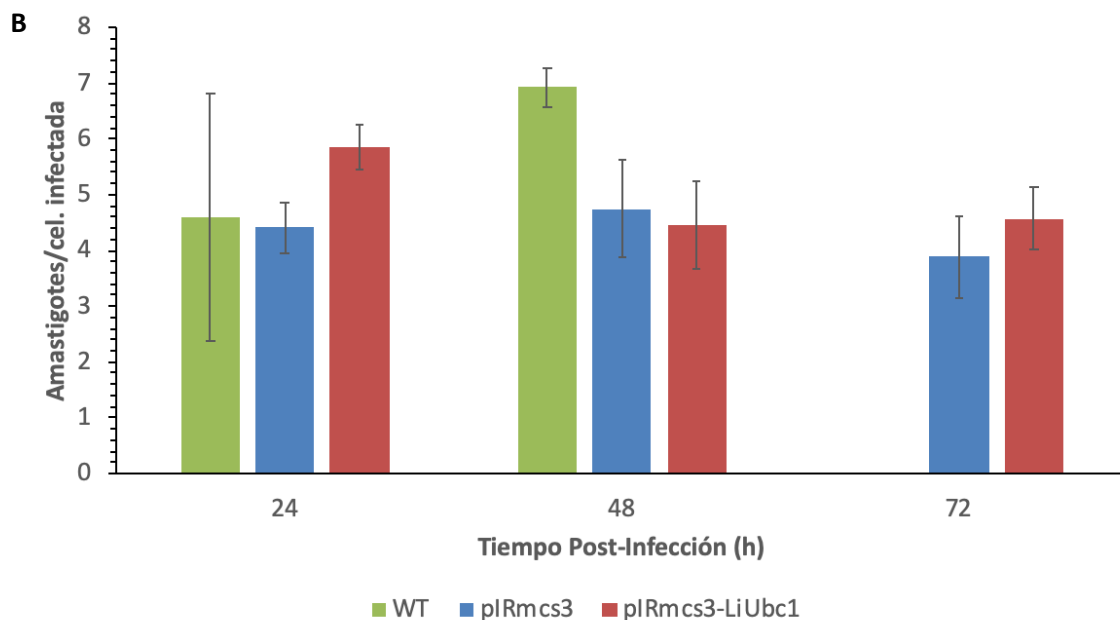
#### 4.6.5. Evaluación de la infectividad de los promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 en la línea celular mieloide humana U937

Con objeto de evaluar la influencia de la sobre-expresión del gen *LiUbc1*. sobre la capacidad infectiva de los promastigotes de *L.infantum*, se llevaron a cabo experimentos de infección *in vitro* de células U937 estimuladas con PMA.

La Figura 30A muestra el porcentaje de células infectadas a las 24 y 48h después de la infección. Como puede verse, la capacidad de infección disminuye en el control pIRmcs3 y en la línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 con respecto a los promastigotes silvestres. No obstante, estos

últimos no constituyen un buen control porque no han sido sometidos al proceso de electroporación y selección con nourseotricina. El control de cepa silvestre utilizado como control de selección es irrecuperable. El control adecuado en todos los casos, es el pIRmcs3, que ha sufrido todo el proceso de selección. El pIRmcs3-LiUbc1 presenta un ligero incremento estadísticamente significativo (t de Student,  $p < 0,05$ ) en la infección en el número de amastigotes por célula infectada en relación con el control pIRmcs3 (Figura 30B). En el resto de los casos no se observan diferencias significativas. Estos datos sugieren que la presencia de mayores cantidades de la proteína LiUbc1, y por tanto su capacidad de intervenir en el catabolismo de proteínas, no afecta a la capacidad de los promastigotes de infectar a los macrófagos, pero podría incrementar la facilidad de transformación en amastigotes y su resistencia a los mecanismos de eliminación del parásito desencadenados por los macrófagos durante las primeras horas de la infección. La infección a las 72 h depende, en gran parte de los amastigotes de células previamente infectadas, por lo que no se pueden obtener conclusiones claras en este tiempo de infección.





**Figura 30. Infectividad de los promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 en la línea celular humana U937.**  
**A.** Número de células infectadas a las 24, 48 y 72 horas. **B.** Número de amastigotes por célula. Barras verdes: cepa silvestre; barras azules control pIRmcs3; barras rojas promastigotes pIRmcs3-LiUbc1.

#### 4.7. EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA INFANTUM* DE HAMSTERS VACUNADOS CON LA PROTEÍNA LIUBC1.

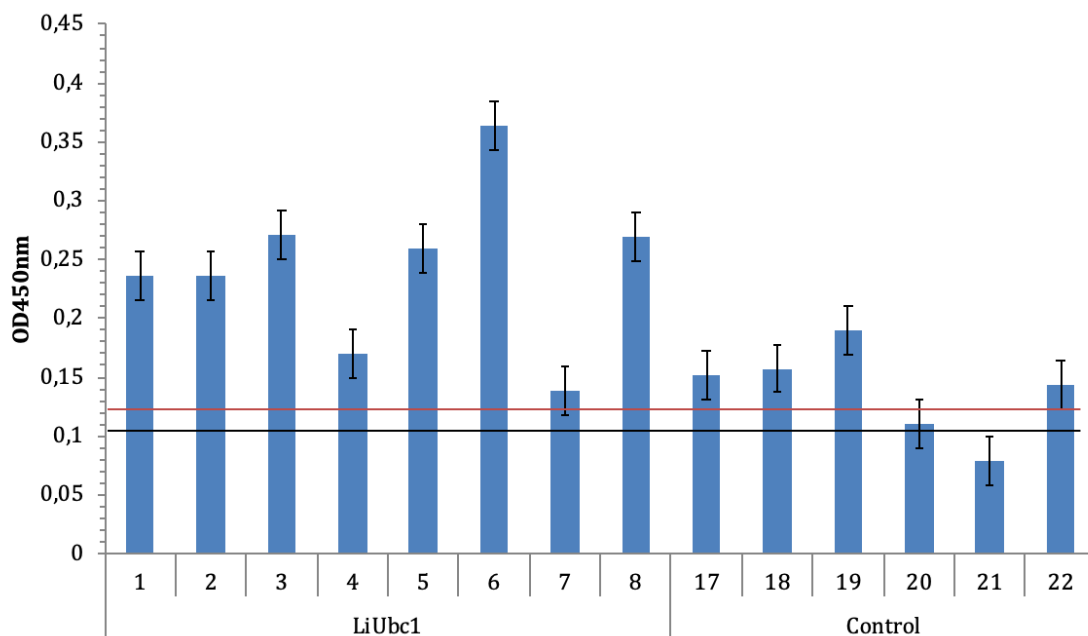
Para comprobar la posible capacidad de inducir protección frente a la infección por *L. infantum*, se realizó un experimento de infección en hámster sirio con la colaboración de las Dras. Mercedes Domínguez e Inmaculada Moreno (Instituto Salud Carlos III). El hámster es un buen modelo porque se infecta con el parásito presentando signos clínicos y produciendo una respuesta del sistema inmune que se puede detectar. La infección experimental se llevó a cabo con  $10^5$  promastigotes por animal, y al cabo de 90 días se sacrificaron y se extrajeron el hígado y el bazo.

Se midió la protección frente a la infección determinando la carga parasitaria mediante dilución límite. Como puede verse en la Tabla 8, el 60% de los animales control se encontraban infectados, mientras que solo 1 de los 8 animales en los que se había inoculado la proteína LiUbc1 mostró la presencia de *L. infantum* en los órganos diana. Así pues, como se sugiere en los experimentos de infección *in vitro*, la proteína LiUbc1 protege frente a la infección por el parásito en el modelo de hámster y es por tanto un prometedor candidato vacunal.



**Tabla 8. Evaluación de la carga parasitaria mediante dilución límite en el experimento de protección frente a la infección por *L. infantum* de hamsters inoculados con la proteína LiUbc1.** Se realizaron 4 réplicas técnicas de las diluciones seriadas. La media geométrica de la dilución límite ( $M_G$ ) se utilizó para calcular el número de amastigotes por gramo de tejido.

GRUPO	Nº Muestra	Peso Bazo (g)	Peso Hígado (g)	$M_G$ Dilución límite		Amas./g bazo	Amas./g hígado
				Bazo	Hígado		
<b>LiUbc1</b>	1	0,1123	1,1222	-	-	-	-
	2	0,1099	0,9555	-	-	-	-
	3	0,0844	0,4152	-	-	-	-
	4	0,1236	0,8595	-	-	-	-
	5	0,1025	1,4934	-	-	-	-
	6	0,0844	1,3640	-	-	-	-
	7	0,0925	1,3262	-	-	-	-
	8	0,1299	1,1154	-	256	-	3442
<b>Control</b>	17	0,1371	0,8632	-	-	-	-
	18	0,0972	1,1846	16	-	2469	-
	19	0,1161	0,9550	-	-	-	-
	20	0,1171	1,0300	-	-	-	-
	21	0,0752	1,3966	32	-	6382	-
	22	0,1738	1,0078	256	-	22094	-



**Figura 31. Producción de IgGs totales en los animales del experimento de protección.** La determinación se realizó mediante la técnica de ELISA en sueros obtenidos al final del experimento de protección. La línea base roja representa el control positivo (0,125 OD) y la línea base negra representa el control negativo (0,105 OD).

Todos los hámsters inoculados con LiUbc1 fueron positivos a IgG total anti-SLA. En el grupo control, sólo el hámster 21 resultó ser negativo (Figura 31), si bien era positivo en cuanto a carga parasitaria (Tabla 8). Como puede verse, la producción de inmunoglobulinas IgG anti-SLA totales es superior, aunque no en cifras muy elevadas, a la producción de inmunoglobulinas IgG en los animales no vacunados. Este resultado, complementario con el anterior, indica una activación de sistema inmune del criceto por la vacunación con la proteína LiUbc1.

## **5. DISCUSIÓN GLOBAL**

## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

Partiendo de un gen (LinJ.33.2910) que se encuentra sobre-expresado en promastigotes metacíclicos aislados del tubo digestivo del vector *Phlebotomus perniciosus* (Alcolea, Alonso et al. 2016), se ha estudiado la proteína que codifica, tanto desde el punto de vista teórico, como su estructura y funcionalidad. El análisis de secuencia y el modelado molecular muestran que el gen codifica una proteína conjugadora de la ubiquitina E2. La secuencia de la proteína presenta un elevado grado de homología con los componentes del género *Leishmania*, más con las especies del subgénero *Leishmania* (*L. donovani*, *L. major*) que con las del subgénero *Viannia*, frecuente en el Nuevo Mundo (*L. braziliensis*). También muestra semejanza (82%) con el tripanosomátido *Crithidia fasciculata*, cuyo ciclo es monogenético que no infecta a los mamíferos (Alcolea, Alonso et al. 2014). Esta homología disminuye con *Trypanosoma spp.* El porcentaje de homología desciende considerablemente tanto en *T. cruzi* como en *T. gambiense*, así como en ratón y el hombre. Este hecho, sugiere que la proteína LiUbc1 podría ser un buen candidato como diana terapéutica y/o molécula protectora vacunal, ya que se detectan diferencias apreciables respecto a las proteínas homólogas del hospedador. La estructura predicha para la proteína muestra una gran semejanza con su homóloga de *S. cerevisiae* (Merkley and Shaw 2004), mientras que esta semejanza estructural en cuanto a su posición espacial de hélices alfa como de láminas beta no es tan acusada en las proteínas correspondientes de los mamíferos superiores incluidos en la comparación (Sheng, Hong et al. 2012). La estructura tridimensional de la proteína Ubc1 de *S. cerevisiae* se resolvió por RMN, mostrando que se encuentra dispuestas en forma de dímero con dos cadenas idénticas, A y B (Merkley and Shaw 2004). La proteína LiUbc1, de acuerdo al modelado, es superponible a la de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que también podría tratarse de un homodímero (Figura 16). En el caso de *H. sapiens* (Figura 17), la estructura de LiUbc1 muestra semejanzas con el dominio N-terminal conservado de esta proteína y carece del dominio C-terminal.

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se clonó el gen *LiUbc1* en un vector de expresión, determinándose las condiciones óptimas de inducción en el sistema heterólogo de *E. coli*. Se evaluó la solubilidad de la proteína recombinante LiUbc1 observándose que es parcialmente soluble. La purificación de la proteína soluble resultó infructuosa por su labilidad y su tendencia a la agregación que la hacía precipitar, optándose por purificar la fracción insoluble, solubilizada mediante el uso de detergentes y purificada mediante cromatografía de afinidad con  $\text{Ni}^{2+}$ . En caso de que fuera necesario realizar ensayos enzimáticos, se podría plantear la purificación como proteína de fusión con MBP. Sin embargo, los objetivos planteados

no requieren disponer de la proteína soluble, y se pudo purificar en condiciones desnaturalizantes.

El patrón electroforético de la proteína LiUbc1 en presencia de detergentes como el SDS y agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol o el DTT resultó ser complejo. Además de la banda de peso molecular de 35kDa, que se corresponde con el teórico, se observa otra intensa con un peso molecular aproximado de 70kDa (Figura 21) que podría corresponder a un dímero de la proteína. Para despejar dudas sobre si se había purificado correctamente la proteína, se aislaron y analizaron las diferentes bandas electroforéticas y se comprobó mediante LC-MS que se trataba de la proteína LiUbc1 en todos los casos (Figura 22 y Tabla 6). De esta manera, se confirma que se trata de una proteína que forma dímeros, como sugieren los modelos moleculares realizados. La existencia de bandas intermedias indica que la proteína es sensible a la degradación, incluso en presencia de inhibidores de proteasas. La obtención de la proteína en forma purificada permitió generar un anticuerpo específico conejo anti-LiUbc1 que resultó de gran utilidad tanto en los estudios de expresión a lo largo del ciclo de desarrollo del parásito como posteriormente para la determinación de su localización subcelular. Así mismo, permitió detectar diferencias, mediante *Western blot*, de los niveles de proteína entre monómeros y dímeros, dependiendo de las diferentes condiciones de cultivo y de los aislados utilizados. También mostró lo que podrían ser productos de degradación o posibles variantes de la proteína en virtud de posibles procesos de *trans-splicing* alternativo. De hecho, en estudios de RNA-seq se ha observado la presencia de diferentes versiones de cada transcrito en cuanto a la posición de inicio del sitio de *trans-splicing* (Alcolea, Alonso et al. 2018, Myler, McDonald et al. 2019).

Al tratarse de una proteína de regulación, resulta relevante estudiar la expresión de la proteína a lo largo del ciclo de desarrollo del parásito a través de sus diferentes fases de cultivo desde la logarítmica, de alta proliferación, hasta la fase estacionaria, de escasa división celular y con mayor presencia de promastigotes metacíclicos, mas infectivos. Los patrones de crecimiento fueron diferentes. Mientras que los promastigotes procedentes del aislado MCAN/ES/MON1/Z001 mostraron un patrón hiperbólico de crecimiento, el aislado procedente del brote de Fuenlabrada IPER/ES/2013/ATE1FL6 (Jiménez, Gonzalez et al. 2013) mostró un patrón con una fase lag más prolongada y un crecimiento exponencial, alcanzando el *plateau* correspondiente a la fase estacionaria y un comienzo más rápido de la fase de muerte (Figura 23). También se estudiaron los patrones de expresión a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo axénico en los dos aislados y se llevaron a cabo experimentos de expresión relativa mediante *Western blot* (Figura 25). En primer lugar se observó la presencia

de formas monoméricas y diméricas en ambos aislados como se había visto en la obtención de la proteína recombinante y según se confirmó por espectrometría de masas (Figura 22 y 25, Tabla 6). Además, existe una interesante diferencia entre la forma monomérica y la dimérica dependiendo del aislado que se trate, lo que sugiere una actividad diferente, con mayor presencia de los monómeros en el aislado IPER/ES/2013/ATE1FL6. La expresión de LiUbc1 mostró también variaciones en sus niveles a lo largo de la curva de crecimiento entre los dos aislados considerados. En el caso del aislado de Fuenlabrada, la abundancia de LiUbc1 es menor, tanto en el monómero como en el dímero, en la fase estacionaria. Sin embargo, se observa un patrón similar en las subpoblaciones metacíclicas PNA- y en la PNA+ aisladas del cultivo en la fase estacionaria. Sin embargo, se observó la sobre-expresión del gen *LiUbc1* en el nivel de transcrito en promastigotes metacíclicos de *L. infantum* aislados de la válvula estomodeal del vector *P. perniciosus* (Alcolea, Alonso et al. 2016). Considerando que técnicamente es todavía inviable realizar estudios de expresión en promastigotes del tubo digestivo del flebotomo por la reducida cantidad de promastigotes que se obtienen, actualmente no es posible confirmarlo en el nivel de proteína (Alcolea, Alonso et al. 2019). Es probable que las diferencias observadas no se deban a modificaciones en el genoma si no a factores desconocidos, tales como el origen epidemiológico (Jiménez, Gonzalez et al. 2013), la existencia de factores epigénéticos desconocidos o la amplificación de fragmentos cromosómicos como sucede en el caso de algunas resistencias frente a metales (Leprohon, Legare et al. 2009, Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018).

Esta proteína, de acuerdo con la literatura (Deshaies and Joazeiro 2009), junto con las proteína activadora E1 y la ligasa E3, tiene una función de regulación del sistema ubiquitina-proteasoma. Dado que hay diferentes ubiquitinas en la célula con funciones diferentes (Deshaies and Joazeiro 2009), resulta relevante estudiar la localización de la misma dentro de la célula de *Leishmania* para intentar deducir las funciones con las que podría estar relacionada. Así, se ha llevado a cabo la localización subcelular de LiUbc1 en el parásito (Figura 26). La inmunofluorescencia indirecta, realizada con el anticuerpo específico anti-LiUbc1, ha mostrado claramente una distribución de la proteína en forma particulada en el parásito. La señal de fluorescencia de Alexa 488 co-localiza con la señal del DAPI, lo que sugiere que LiUbc1 se encuentra en el núcleo y en otra estructura cerca de la base del flagelo, probablemente el kinetoplasto. Los estudios de microscopia electrónica utilizando marcaje con oro coloidal han confirmado esta distribución (Figura 27). La proteína se encuentra localizada, por una parte, en la membrana nuclear del parásito y por otra, en el kinetoplasto y en el bolsillo flagelar del mismo. Esto concuerda con la funcionalidad esperada de la proteína, ya que son dos zonas que podrían

requerir una gran actividad de la ubiquitina, como se justifica a continuación. En el caso del bolsillo flagelar y del kinetoplasto, para responder a las necesidades energéticas del movimiento del flagelo o del centro organizador de microtúbulos, ya que se ha demostrado en otros organismos que estas proteínas intervienen en la promoción de la anafase (Rodrigo-Brenni and Morgan 2007). En el caso de la membrana nuclear, para las funciones de regulación, concretamente a través de la modificación post-traducciona de tipo ubiquitinación (Goos, Dejung et al. 2019), ya que en esta estructura tiene lugar la gran actividad de regulación del tránsito de moléculas desde el núcleo al citoplasma celular en un parásito que tiene, como una de sus señas de identidad, la regulación post-traducciona.

*Leishmania* tiene aproximadamente 8.300 genes en total y de ellos, muchos son esenciales. Este hecho dificulta la obtención de transfectados *Knock-out* para diferentes proteínas útiles para detectar su actividad, se optó por la obtención de transfectantes *Knock-in*, para estudiar la funcionalidad *in vivo* de la proteína LiUbc1. La línea *knock-in* se obtuvo en promastigotes procedentes del aislado del brote de Fuenlabrada IPER/ES/2013/ATE1FL6 utilizando el vector integrativo pIRmcs3 para la sobre-expresión de la proteína LiUbc1 (Hoyer, Zander et al. 2004). La línea de promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 modifica su patrón de crecimiento, siendo más rápido desde los instantes iniciales (Figura 28). Por otro lado, cambia el patrón de agregación de la proteína, con mas presencia del monómero frente al dímero (Figura 29). Se observa que en los dos primeros días de cultivo existen altos niveles de la proteína LiUbc1. Este predominio del monómero va disminuyendo a lo largo de los días de cultivo. También se observa degradación parcial a día 1 de cultivo (Figura 29). Es decir, una pequeña modificación genómica revierte el patrón especial de crecimiento de la cepa Fuenlabrada IPER/ES/2013/ATE1FL6 al de tipo exponencial. Este tipo de comportamiento se ha detectado en otras líneas de tripanosomátidos (Degayon 2017). Una vez comprobada la estabilidad de los transfectantes *knock-in* de LiUbc1, se procedió a estudiar la influencia de esta sobre-expresión sobre la capacidad infectiva *in vitro* y protectora *in vivo* del parásito.

La infección *in vitro* de células U937 activadas por parte de los promastigotes *knock-in* de *L. infantum*, mostró que la elevación de lo niveles de proteína LiUbc1 en el promastigote no aumenta significativamente la capacidad de infección del mismo en la célula macrofágica en las primeras 24h con respecto al aislado silvestre, pero sí incrementa la supervivencia de los amastigotes en los macrófagos a las 48 horas después de la infección. Este hecho sugiere una relación entre la proteína y los mecanismos iniciales de infección de *L. infantum*, permitiendo al parásito resistir los mecanismos de eliminación que desencadena el macrófago, lo que hace que LiUbc1 pueda ser un pre-candidato para molécula protectora vacunal. Esta posibilidad se midió

mediante un experimento de protección frente a la infección *in vivo* en el modelo de *Mesocricetus auratus*. El experimento mostró que los animales previamente inoculados con la proteína LiUbc1 con dos dosis presentaban una protección significativa, en términos de reducción de carga parasitaria, frente a la infección con respecto a los controles no vacunados (12% de los animales infectados frente al 60% del grupo control), lo que sugiere que la proteína está relacionada con los mecanismos de infección del parásito y puede ser considerada como un candidato vacunal.

En conjunto, se ha estudiado la proteína LiUbc1, cuyo gen LinJ33.2910 se encuentra sobre-expresado en promastigotes metacíclicos de *L. infantum*, obtenidos de la válvula estomodeal del vector (Alcolea, Alonso et al. 2016), es decir en la fase previa a la infección al mamífero. Si bien no es posible validar este dato en el nivel de proteína, (Alcolea, Alonso et al. 2019), la mayor infectividad de la línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 concuerda con este dato. De acuerdo a la teoría de la pre-adaptación, este aumento debería contribuir a la preparación del parásito para resistir durante el proceso de infección la acción de defensa del sistema inmune del huésped y contribuir a su supervivencia dentro del hospedador mamífero.

Además, la obtención y estudio de la proteína conjugadora de la ubiquitina E2 ha permitido también aumentar el conocimiento sobre la expresión de este tipo de proteínas que a lo largo de la escala biológica se encuentran implicadas en numerosos procesos esenciales para la supervivencia celular. No obstante, parece existir una clara especificidad, pues la proteína se encuentra en zonas de alto requerimiento energético, como el bolsillo flagelar y de alta actividad reguladora en los tripanosomátidos como la membrana nuclear (Gardner, Nelson et al. 2005, Goos, Dejung et al. 2019) y sin embargo no aparece en los glicosomas, donde se produce gran parte de la actividad metabólica y la consecuente necesidad de degradación de proteínas. Así, los datos sugieren que la proteína LiUbc1 es una proteína más de la función reguladora de ubiquitina que de la de degradación. La reciente publicación de datos sobre la posible utilización de estos procesos de ubiquitinación en bloqueos de crecimiento de células cancerosas mediante la síntesis de análogos que eliminan los productos de K-ras (Blasco, Navas et al. 2019) hace que el estudio de estas proteínas en eucariotas primitivos, como es el caso de *L. infantum* incrementa su interés. Ya que nos ayuda a comprender mejor los procesos celulares básicos que pueden concretarse en procesos más complejos y con utilidad terapéutica, bien sea en un mecanismo de infección como en el bloqueo de proliferaciones celulares.



## **6. CONCLUSIONES**

1. Se ha purificado la proteína activadora de ubiquitina E2 (LiUbc1) recombinante de *Leishmania infantum*.
2. El grado de identidad de secuencia de LiUbc1 con proteínas homólogas de *Leishmania spp.* es elevado y, de acuerdo al modelado molecular, muestra una estructura similar al homólogo de *Saccharomyces cerevisiae* (1TTE). El dominio C-terminal de LiUbc1 no está presente en el de la humana (1ZDN).
3. Los aislados MCAN/ES/MON1/Z001 e IPER/ES/2013/ATE1FL6 de *Leishmania infantum* muestran un patrón de expresión diferente de la proteína LiUbc1.
4. Se ha obtenido una línea de promastigotes *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 de *Leishmania infantum* en la que inicialmente se alcanzan niveles muy elevados de la proteína, que disminuyen gradualmente a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo axénico.
5. La proteína LiUbc1 se localiza en la membrana nuclear y en la zona del kinetoplasto y del bolsillo flagelar, tanto en promastigotes silvestres como en la línea *knock-in*.
6. La línea *knock-in* pIRmcs3-LiUbc1 da lugar a un mayor número medio de amastigotes por célula fagocítica infectada a las 24h post-infección con respecto a la cepa silvestre.
7. La proteína LiUbc1 induce protección parcial frente a la infección por *Leishmania infantum* en el modelo de hámster sirio.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Aagaard-Hansen, J., N. Nombela and J. Alvar (2010). "Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases." Trop Med Int Health **15**(11): 1281-1288.

Ajdary, S., M. H. Alimohammadian, M. B. Eslami, K. Kemp and A. Kharazmi (2000). "Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection." Infect Immun **68**(4): 1760-1764.

Akopyants, N. S., R. S. Matlib, E. N. Bukanova, M. R. Smeds, B. H. Brownstein, G. D. Stormo and S. M. Beverley (2004). "Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **136**(1): 71-86.

Alcolea, P. J., A. Alonso, L. Baugh, C. Paisie, G. Ramasamy, A. Sekar, A. Sur, M. Jimenez, R. Molina, V. Larraga and P. J. Myler (2018). "RNA-seq analysis reveals differences in transcript abundance between cultured and sand fly-derived *Leishmania infantum* promastigotes." Parasitol Int **67**(4): 476-480.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. Dominguez, V. Parro, M. Jimenez, R. Molina and V. Larraga (2016). "Influence of the Microenvironment in the Transcriptome of *Leishmania infantum* Promastigotes: Sand Fly versus Culture." PLoS Negl Trop Dis **10**(5): e0004693.

Alcolea, P. J., A. Alonso, A. Esteban, P. Peris, A. Cortes, J. A. Castillo and V. Larraga (2019). "IL12 p35 and p40 subunit genes administered as pPAL plasmid constructs do not improve protection of pPAL-LACK vaccine against canine leishmaniasis." PLoS One **14**(2): e0212136.

Alcolea, P. J., A. Alonso, F. Garcia-Tabares, A. Torano and V. Larraga (2014). "An Insight into the proteome of *Crithidia fasciculata* choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of *Leishmania* spp. promastigotes." PLoS One **9**(12): e113837.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. J. Gomez, I. Moreno, M. Dominguez, V. Parro and V. Larraga (2010). "Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage." Int J Parasitol **40**(13): 1497-1516.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. J. Gomez, M. Postigo, R. Molina, M. Jimenez and V. Larraga (2014). "Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: from the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte." BMC Genomics **15**: 849.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. J. Gomez, A. Sanchez-Gorostiaga, M. Moreno-Paz, E. Gonzalez-Pastor, A. Torano, V. Parro and V. Larraga (2010). "Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*." BMC Genomics **11**: 31.

Alcolea, P. J., A. Alonso and V. Larraga (2011). "Proteome profiling of *Leishmania infantum* promastigotes." J Eukaryot Microbiol **58**(4): 352-358.

Alcolea, P. J., A. Alonso, R. Molina, M. Jimenez, P. J. Myler and V. Larraga (2019). "Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes." PLoS Negl Trop Dis **13**(5): e0007288.

Alexander, B. and M. Maroli (2003). "Control of phlebotomine sandflies." Med Vet Entomol **17**(1): 1-18.

Alvar, J. (2001). Las leishmaniasis : de la biología al control. Salamanca, Laboratorios Intervet.

Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez and J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." Clin Microbiol Rev **21**(2): 334-359, table of contents.

Antunes, C. M., W. Mayrink, P. A. Magalhaes, C. A. Costa, M. N. Melo, M. Dias, M. S. Michalick, P. Williams, A. O. Lima, J. B. Vieira and et al. (1986). "Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis." Int J Epidemiol **15**(4): 572-580.

Arce, A., A. Estirado, M. Ordobas, S. Sevilla, N. Garcia, L. Moratilla, S. de la Fuente, A. M. Martinez, A. M. Perez, E. Aranguez, A. Iriso, O. Sevillano, J. Bernal and F. Vilas (2013). "Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012." Euro Surveill **18**(30): 20546.

Bacellar, O., A. D'Oliveira, Jr., S. Jeronimo and E. M. Carvalho (2000). "IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis." Cytokine **12**(8): 1228-1231.

Badaro, R., M. C. Eulalio, D. Benson, M. Freire, J. C. Miranda, D. Pedral-Sampaio, J. M. Burns, J. R. David, Jr., W. D. Johnson and S. G. Reed (1993). "Sensitivity and specificity of a recombinant *Leishmania chagasi* antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis." Arch Inst Pasteur Tunis **70**(3-4): 331-332.

Baneth, G., A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau and L. Ferrer (2008). "Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one." Trends Parasitol **24**(7): 324-330.

Bañuls, A. L., M. Hide and F. Prugnolle (2007). "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." Adv Parasitol **64**: 1-109.

Barbieri, C. L. (2006). "Immunology of canine leishmaniasis." Parasite Immunol **28**(7): 329-337.

Bates, P. A. (1993). "Axenic culture of *Leishmania* amastigotes." Parasitol Today **9**(4): 143-146.

Ben Salah, A., N. Ben Messaoud, E. Guedri, A. Zaatour, N. Ben Alaya, J. Bettaieb, A. Gharbi, N. Belhadj Hamida, A. Boukthir, S. Chlif, K. Abdelhamid, Z. El Ahmadi, H. Louzir, M. Mokni, G. Morizot, P. Buffet, P. L. Smith, K. M. Kopydlowski, M. Kreishman-Deitrick, K. S. Smith, C. J. Nielsen, D. R. Ullman, J. A. Norwood, G. D. Thorne, W. F. McCarthy, R. C. Adams, R. M. Rice, D. Tang, J. Berman, J. Ransom, A. J. Magill and M. Grogl (2013). "Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis." N Engl J Med **368**(6): 524-532.

Bente, M., S. Harder, M. Wiesgigl, J. Heukeshoven, C. Gelhaus, E. Krause, J. Clos and I. Bruchhaus (2003). "Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*." Proteomics **3**(9): 1811-1829.

Berman, J. D. (1981). "Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures." Am J Trop Med Hyg **30**(3): 566-569.

Bhandari, D., K. Guha, N. Bhaduri and P. Saha (2011). "Ubiquitination of mRNA cycling sequence binding protein from *Leishmania donovani* (LdCSBP) modulates the RNA endonuclease activity of its Smr domain." FEBS Lett **585**(5): 809-813.

Blasco, M. T., C. Navas, G. Martin-Serrano, O. Grana-Castro, C. G. Lechuga, L. Martin-Diaz, M. Djurec, J. Li, L. Morales-Cacho, L. Esteban-Burgos, J. Perales-Paton, E. Bousquet-Mur, E. Castellano, H. K. C. Jacob, L. Cabras, M. Musteanu, M. Drosten, S. Ortega, F. Mulero, B. Sainz, Jr., N. Dusetti, J. Iovanna, F. Sanchez-Bueno, M. Hidalgo, H. Khiabani, R. Rabadan, F. Al-Shahrour, C. Guerra and M. Barbacid (2019). "Complete Regression of Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas upon Combined Inhibition of EGFR and C-Raf." Cancer Cell **35**(4): 573-587 e576.

- Boggiatto, P. M., K. N. Gibson-Corley, K. Metz, J. M. Gallup, J. M. Hostetter, K. Mullin and C. A. Petersen (2011). "Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America." PLoS Negl Trop Dis **5**(4): e1019.
- Bray, P. G., M. P. Barrett, S. A. Ward and H. P. de Koning (2003). "Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future." Trends Parasitol **19**(5): 232-239.
- Brennicke, A., A. Marchfelder and S. Binder (1999). "RNA editing." FEMS Microbiol Rev **23**(3): 297-316.
- Bringaud, F., M. Muller, G. C. Cerqueira, M. Smith, A. Rochette, N. M. El-Sayed, B. Papadopoulou and E. Ghedin (2007). "Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*." PLoS Pathog **3**(9): 1291-1307.
- Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. Garin, N. Nassar and F. Derouin (1995). "Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice." Antimicrob Agents Chemother **39**(9): 2167-2168.
- Cavalier-Smith, T. (1998). "A revised six-kingdom system of life." Biol Rev Camb Philos Soc **73**(3): 203-266.
- Chang, K. P. and D. M. Dwyer (1976). "Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro." Science **193**(4254): 678-680.
- Chulay, J. D., L. Fleckenstein and D. H. Smith (1988). "Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(1): 69-72.
- Clayton, C. and M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." Molecular and Biochemical Parasitology **156**: 93-101.
- Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette and P. C. Cotrim (2007). "Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 3030-3032.
- Cohen-Freue, G., T. R. Holzer, J. D. Forney and W. R. McMaster (2007). "Global gene expression in *Leishmania*." Int J Parasitol **37**(10): 1077-1086.

- Cojean, S., S. Houze, D. Haouchine, F. Huteau, S. Lariven, V. Hubert, F. Michard, C. Bories, F. Pratlong, J. Le Bras, P. M. Loiseau and S. Matheron (2012). "Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker." Emerg Infect Dis **18**(4): 704-706.
- Convit, J., M. E. Pinardi and A. J. Rondon (1972). "Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host." Trans R Soc Trop Med Hyg **66**(4): 603-610.
- Cortes, S., M. O. Afonso, C. Alves-Pires and L. Campino (2007). "Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal." Emerg Infect Dis **13**(9): 1431-1432.
- Cristobo, I., M. J. Larriba, V. de los Rios, F. Garcia, A. Munoz and J. I. Casal (2011). "Proteomic analysis of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 action on human colon cancer cells reveals a link to splicing regulation." J Proteomics **75**(2): 384-397.
- Cruz, I., M. Morales, I. Noguer, A. Rodríguez and J. Alvar (2002). "Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users." Lancet **359**: 1124-1125.
- da Silva, R. and D. L. Sacks (1987). "Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation." Infect Immun **55**(11): 2802-2806.
- David, C. V. and N. Craft (2009). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Dermatol Ther **22**(6): 491-502.
- Dawson, T. M. and V. L. Dawson (2003). "Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease." Science **302**(5646): 819-822.
- de Freitas, E., M. N. Melo, A. P. da Costa-Val and M. S. Michalick (2006). "Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors." Vet Parasitol **137**(1-2): 159-167.
- Debrabant, A., M. B. Joshi, P. F. Pimenta and D. M. Dwyer (2004). "Generation of Leishmania donovani axenic amastigotes: their growth and biological characteristics." Int J Parasitol **34**(2): 205-217.
- Degayon, M. A. (2017). Caracterización de proteína-fosfatasa de tipo 1 de Leishmania infantum y estudio mediante RNA-seq las alteraciones en la expresión génica diferencial inducidas en líneas knock-in, Universidad Complutense de Madrid.



Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.

Desjeux, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(3): 239-243.

Dey, A. and S. Singh (2006). "Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature." Indian Journal of Medical Microbiology **24**: 165-170.

Docampo, R. and S. N. Moreno (1999). "Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites." Parasitol Today **15**(11): 443-448.

El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renauld, E. A. Wortley, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D. C. Bartholomeu, B. J. Haas, A. N. Tran, J. R. Wortman, U. C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J. M. Carlton, G. C. Cerqueira, T. Creasy, A. L. Delcher, A. Djikeng, T. M. Embley, C. Hauser, A. C. Ivens, S. K. Kummerfeld, J. B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S. L. Salzberg, J. Shallom, J. C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S. E. Melville, J. E. Donelson, B. Andersson, K. D. Stuart and N. Hall (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-409.

Fernandez Cotrina, J., V. Iniesta, I. Monroy, V. Baz, C. Hugnet, F. Maranon, M. Fabra, L. C. Gomez-Nieto and C. Alonso (2018). "A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend(R) against canine leishmaniosis." Vaccine **36**(15): 1972-1982.

Fernandez, M. M., E. L. Malchiodi and I. D. Algranati (2011). "Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 86-93.

Ferrer, L. (1989). "[Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician]." Enferm Infecc Microbiol Clin **7**(6): 293-295.

Figueiró-Filho, E., G. Duarte, P. El-Beitune, S. Quintana and T. Maia (2004). "Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy." Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology **12**: 31-40.

Folgueira, C., L. Quijada, M. Soto, D. R. Abanades, C. Alonso and J. M. Requena (2005). "The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-

untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms." J Biol Chem **280**(42): 35172-35183.

Franco, A. O., C. R. Davies, A. Mylne, J. P. Dedet, M. Gallego, C. Ballart, M. Gramiccia, L. Gradoni, R. Molina, R. Galvez, F. Morillas-Marquez, S. Baron-Lopez, C. A. Pires, M. O. Afonso, P. D. Ready and J. Cox (2011). "Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables." Parasitology **138**(14): 1878-1891.

Gannavaram, S., P. S. Connelly, M. P. Daniels, R. Duncan, P. Salotra and H. L. Nakhasi (2012). "Deletion of mitochondrial associated ubiquitin fold modifier protein Ufm1 in *Leishmania donovani* results in loss of beta-oxidation of fatty acids and blocks cell division in the amastigote stage." Mol Microbiol **86**(1): 187-198.

Gardner, R. G., Z. W. Nelson and D. E. Gottschling (2005). "Degradation-mediated protein quality control in the nucleus." Cell **120**(6): 803-815.

Ghalib, H. W., M. R. Piuvezam, Y. A. Skeiky, M. Siddig, F. A. Hashim, A. M. el-Hassan, D. M. Russo and S. G. Reed (1993). "Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections." J Clin Invest **92**(1): 324-329.

Gilchrist, L. S., D. M. Cain, C. Harding-Rose, A. N. Kov, G. Wendelschafer-Crabb, W. R. Kennedy and D. A. Simone (2005). "Re-organization of P2X3 receptor localization on epidermal nerve fibers in a murine model of cancer pain." Brain Res **1044**(2): 197-205.

Girard, J. R., J. L. Tenthorey and D. O. Morgan (2015). "An E2 accessory domain increases affinity for the anaphase-promoting complex and ensures E2 competition." J Biol Chem **290**(40): 24614-24625.

Gluezn, E., M. L. Ginger and P. G. McKean (2010). "Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle." Curr Opin Microbiol **13**(4): 473-479.

Gomes, D. C., E. F. Pinto, L. D. de Melo, W. P. Lima, V. Larraga, U. G. Lopes and B. Rossi-Bergmann (2007). "Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice." Vaccine **25**(12): 2168-2172.

Gonzalo, R. M., G. del Real, J. R. Rodriguez, D. Rodriguez, R. Heljasvaara, P. Lucas, V. Larraga and M. Esteban (2002). "A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia

virus expressing the Leishmania infantum P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis." Vaccine **20**(7-8): 1226-1231.

Goos, C., M. Dejung, A. M. Wehman, M. N. E. J. Schmidt, J. Sunter, M. Engstler, F. Butter and S. Kramer (2019). "Trypanosomes can initiate nuclear export co-transcriptionally." Nucleic Acids Res **47**(1): 266-282.

Gossage, S. M., M. E. Rogers and P. A. Bates (2003). "Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle." Int J Parasitol **33**(10): 1027-1034.

Gradoni, L. (2015). "Canine Leishmania vaccines: still a long way to go." Vet Parasitol **208**(1-2): 94-100.

Gumy, A., J. A. Louis and P. Launois (2004). "The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds." Int J Parasitol **34**(4): 433-444.

Hallengren, J., P. C. Chen and S. M. Wilson (2013). "Neuronal ubiquitin homeostasis." Cell Biochem Biophys **67**(1): 67-73.

Hanahan, D. and M. Meselson (1983). "Plasmid screening at high colony density." Methods Enzymol **100**: 333-342.

Handman, E. (1999). "Cell biology of Leishmania." Advances in Parasitology **44**: 1-39.

Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clin Microbiol Rev **14**(2): 229-243.

Hegde, A. N. and S. C. Upadhyaya (2007). "The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system." Trends Neurosci **30**(11): 587-595.

Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-1199.

Holzer, T. R., W. R. McMaster and J. D. Forney (2006). "Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in Leishmania mexicana." Mol Biochem Parasitol **146**(2): 198-218.

Hou, W. Y., P. F. Pimenta, R. L. Shen and P. P. Da Silva (1992). "Stereo views and immunogold labeling of the pellicular microtubules at the inner surface of the plasma membrane of *Leishmania* as revealed by fracture-flip." *J Histochem Cytochem* **40**(9): 1309-1318.

Hoyer, C., D. Zander, S. Fleischer, M. Schilhabel, M. Kroener, M. Platzer and J. Clos (2004). "A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest." *Int J Parasitol* **34**(7): 803-811.

Ilg, T. (2001). "Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals." *Med Microbiol Immunol* **190**(1-2): 13-17.

Ivens, A., C. Peacock, E. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. Coulson, A. Cronin, A. Cruz, R. Davies, J. De Gaudenzi, D. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. Mottram, S. Müller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'neil, M. Pentony, T. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schäfer, J. Schein, D. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. Smith, J. Blackwell, K. Stuart, B. Barrell and P. Myler (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." *Science* **309**: 436-442.

Jiménez, M., E. Gonzalez, A. Iriso, E. Marco, A. Alegret, F. Fuster and R. Molina (2013). "Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain." *Parasitol Res* **112**(7): 2453-2459.

Kall, L., J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble and M. J. MacCoss (2007). "Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets." *Nat Methods* **4**(11): 923-925.

Kammerer, D., L. Stevermann and D. Liakopoulos (2010). "Ubiquitylation regulates interactions of astral microtubules with the cleavage apparatus." *Curr Biol* **20**(14): 1233-1243.

Kazemi-Rad, E., M. Mohebbi, M. B. Khadem-Erfan, H. Hajjarian, R. Hadighi, A. Khamesipour, S. Rezaie, M. Saffari, R. Raoofian and M. Heidari (2013). "Overexpression of ubiquitin and amino acid permease genes in association with antimony resistance in *Leishmania tropica* field isolates." Korean J Parasitol **51**(4): 413-419.

Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." Nat Rev Genet **8**(7): 533-543.

Killick-Kendrick, R. (1990). "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review." Medical and Veterinary Entomology **4**(1): 1-24.

Killick-Kendrick, R. (1990). "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review." Med Vet Entomol **4**(1): 1-24.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Killick-Kendrick, R., T. J. Wilkes, M. Bailly, I. Bailly and L. A. Righton (1986). "Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(1): 138-142.

Kuhn, D. and M. Wiese (2005). "LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation." Mol Microbiol **56**(5): 1169-1182.

Lainson, R. and J. J. Shaw (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. . The leishmaniasis in biology and medicine.

. W. Peters and R. Killick-Kendrick: 1-120.

Lam, Y. A., C. M. Pickart, A. Alban, M. Landon, C. Jamieson, R. Ramage, R. J. Mayer and R. Layfield (2000). "Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 9902-9906.

Larreta, R., M. Soto, L. Quijada, C. Folgueira, D. R. Abanades, C. Alonso and J. M. Requena (2004). "The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation." BMC Mol Biol **5**: 3.

- Legare, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2001). "The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase." J Biol Chem **276**(28): 26301-26307.
- Leifso, K., G. Cohen-Freue, N. Dogra, A. Murray and W. R. McMaster (2007). "Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed." Mol Biochem Parasitol **152**(1): 35-46.
- Leprohon, P., D. Legare, F. Raymond, E. Madore, G. Hardiman, J. Corbeil and M. Ouellette (2009). "Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*." Nucleic Acids Res **37**(5): 1387-1399.
- Liang, X., A. Haritan, S. Uliel and S. Michaeli (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryotic Cell **2**: 830-840.
- Lira, R., S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva and D. Sacks (1999). "Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*." J Infect Dis **180**(2): 564-567.
- Loiseau, P. M., S. Cojean and J. Schrevel (2011). "Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance." Parasite **18**(2): 115-119.
- Lukes, J., I. L. Mauricio, G. Schonian, J. C. Dujardin, K. Soteriadou, J. P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Tintaya, M. Jirku, E. Chocholova, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Obornik, A. Horak, F. J. Ayala and M. A. Miles (2007). "Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9375-9380.
- Lux, H., N. Heise, T. Klenner, D. Hart and F. R. Opperdoes (2000). "Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 1-14.
- Mancianti, F. and N. Meciani (1988). "Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis." Am J Vet Res **49**(8): 1409-1411.

Marchini, F. K., L. M. F. d. Godoy, M. Batista, F. G. Kugeratski and M. A. Krieger (2014). Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. A. Santos, M. Branquinha, C. d'Avila-Levy, L. Kneipp and C. Sodré, Springer Netherlands. **74**.

Martinez, S., D. L. Looker, R. L. Berens and J. J. Marr (1988). "The synergistic action of pyrazolopyrimidines and pentavalent antimony against *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*." Am J Trop Med Hyg **39**(3): 250-255.

Martinez-Calvillo, S., J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martinez, R. G. Manning-Cela and E. E. Figueroa-Angulo (2010). "Gene expression in trypanosomatid parasites." J Biomed Biotechnol **2010**: 525241.

Mary, C., V. Auriault, B. Faugere and A. J. Dessein (1999). "Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells." Infect Immun **67**(11): 5559-5566.

McKerrow, J. H., E. Sun, P. J. Rosenthal and J. Bouvier (1993). "The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa." Annu Rev Microbiol **47**: 821-853.

McNicoll, F., J. Drummelsmith, M. Muller, E. Madore, N. Boilard, M. Ouellette and B. Papadopolou (2006). "A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*." Proteomics **6**(12): 3567-3581.

McNicoll, F., M. Muller, S. Cloutier, N. Boilard, A. Rochette, M. Dube and B. Papadopolou (2005). "Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*." J Biol Chem **280**(42): 35238-35246.

Merkley, N. and G. S. Shaw (2004). "Solution structure of the flexible class II ubiquitin-conjugating enzyme Ubc1 provides insights for polyubiquitin chain assembly." J Biol Chem **279**(45): 47139-47147.

Miro, G., A. Montoya, M. Mateo, A. Alonso, S. Garcia, A. Garcia, M. J. Caballero and R. Molina (2007). "A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006)." Parasitol Res **101**(2): 253-257.

Mishra, M., M. P. Singh, D. Choudhury, V. P. Singh and A. B. Khan (1991). "Amphotericin B for second-line treatment of Indian kala-azar." Lancet **337**(8746): 926.

- Molina, R., C. Canavate, E. Cercenado, F. Laguna, R. Lopez-Velez and J. Alvar (1994). "Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*." AIDS **8**(2): 277-279.
- Molina, R., M. Jiménez, I. Cruz, A. Iriso, I. Martín-Martín, O. Sevillano, S. Melero and J. Bernal (2012). "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain." Veterinary Parasitology **190**: 268-271.
- Molyneux, D. H. and R. W. Ashford (1983). The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals, London : Taylor and Francis.
- Morales, M. A., R. Watanabe, C. Laurent, P. Lenormand, J. C. Rousselle, A. Namane and G. F. Spath (2008). "Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages." Proteomics **8**(2): 350-363.
- Moreno, J. and J. Alvar (2002). "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model." Trends Parasitol **18**(9): 399-405.
- Mullin, K. A., B. J. Foth, S. C. Ilgoutz, J. M. Callaghan, J. L. Zawadzki, G. I. McFadden and M. J. McConville (2001). "Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*." Mol Biol Cell **12**(8): 2364-2377.
- Munoz, C., J. San Francisco, B. Gutierrez and J. Gonzalez (2015). "Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites." Biomed Res Int **2015**: 141526.
- Myler, P. (2008). *Leishmania After the Genome*. P. Myler and N. Fasel. Norfolk, Caister Academic Press.
- Myler, P. J., J. A. McDonald, P. J. Alcolea and A. Sur (2019). "Quantitative RNA Analysis Using RNA-Seq." Methods Mol Biol **1971**: 95-108.
- Nadim, A., E. Javadian, G. Tahvildar-Bidruni and M. Ghorbani (1983). "Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis." Bull Soc Pathol Exot Filiales **76**(4): 377-383.
- Nelson, D. J., S. W. LaFon, J. V. Tuttle, W. H. Miller, R. L. Miller, T. A. Krenitsky, G. B. Elion, R. L. Berens and J. J. Marr (1979). "Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation." J Biol Chem **254**(22): 11544-11549.



Nguyen, A. T., M. A. Prado, P. J. Schmidt, A. K. Sendamarai, J. T. Wilson-Grady, M. Min, D. R. Campagna, G. Tian, Y. Shi, V. Dederer, M. Kawan, N. Kuehnle, J. A. Paulo, Y. Yao, M. J. Weiss, M. J. Justice, S. P. Gygi, M. D. Fleming and D. Finley (2017). "UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation." Science **357**(6350).

Oliva, G., J. Nieto, V. Foglia Manzillo, S. Cappiello, E. Fiorentino, T. Di Muccio, A. Scalone, J. Moreno, C. Chicharro, E. Carrillo, T. Butaud, L. Guegand, V. Martin, A. M. Cuisinier, D. McGahie, S. Gueguen, C. Canavate and L. Gradoni (2014). "A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two leishmania infantum transmission seasons." PLoS Negl Trop Dis **8**(10): e3213.

OMS (2010). "Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis." World Health Organization Geneva.

OMS (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, World Health Organization.

Opperdoes, F. R. and P. A. Michels (1993). "The glycosomes of the Kinetoplastida." Biochimie **75**(3-4): 231-234.

Osman, O. F., L. Oskam, N. C. Kroon, G. J. Schoone, E. T. Khalil, A. M. El-Hassan, E. E. Zijlstra and P. A. Kager (1998). "Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis." J Clin Microbiol **36**(6): 1621-1624.

Otranto, D. and F. Dantas-Torres (2013). "The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health." Trends Parasitol **29**(7): 339-345.

Peacock, C., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. Ruiz, M. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. Depledge, S. Oyola, J. Hilley, L. Brito, L. Tosi, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF and B. M. (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." Nature Genetics **39**: 839-847.

Pennisi, M. G. (2015). "Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update." Vet Parasitol **208**(1-2): 35-47.

- Pinto, E. F., R. O. Pinheiro, A. Rayol, V. Larraga and B. Rossi-Bergmann (2004). "Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK." Infect Immun **72**(8): 4521-4527.
- Purkait, B., A. Kumar, N. Nandi, A. H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V. Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh and P. Das (2012). "Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1031-1041.
- Ramos, H., E. Valdivieso, M. Gamargo, F. Dagger and B. E. Cohen (1996). "Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions." J Membr Biol **152**(1): 65-75.
- Ramos, I., A. Alonso, J. M. Marcen, A. Peris, J. A. Castillo, M. Colmenares and V. Larraga (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response." Vaccine **26**(3): 333-344.
- Ramos, I., A. Alonso, A. Peris, J. M. Marcen, M. A. Abengozar, P. J. Alcolea, J. A. Castillo and V. Larraga (2009). "Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection." Vaccine **27**(48): 6695-6703.
- Rangel, H., F. Dagger, A. Hernandez, A. Liendo and J. A. Urbina (1996). "Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **40**(12): 2785-2791.
- Rastrojo, A., R. Garcia-Hernandez, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **8**(2): 246-264.
- Ready, P. D. (2013). "Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents." Annu Rev Entomol **58**: 227-250.
- Requena, J. M., C. Folgueira, M. C. Lopez and M. C. Thomas (2008). "The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the *Leishmania* genomes, constitute subfamilies showing chromosomal proximity relationship." BMC Genomics **9**: 263.

Rioux J., L. G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J. (1990). "Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification." Annales de Parasitologie Humaine et Comparée **65**: 111-125.

Rioux, J. A. and G. Lanotte (1990). "Leishmania infantum as a cause of cutaneous leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **84**(6): 898.

Robert, L. L., M. J. Perich, Y. Schlein, R. L. Jacobson, R. A. Wirtz, P. G. Lawyer and J. I. Githure (1997). "Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat." J Am Mosq Control Assoc **13**(2): 140-144.

Rochette, A., F. Raymond, J. Corbeil, M. Ouellette and B. Papadopoulos (2009). "Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*." Mol Biochem Parasitol **165**(1): 32-47.

Rojas, F., J. Koszela, J. Bua, B. Llorente, R. Burchmore, M. Auer, J. C. Mottram and M. T. Tellez-Inon (2017). "The ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 is essential for cytokinesis in contrast to putative subunits of a SCF complex in *Trypanosoma brucei*." PLoS Negl Trop Dis **11**(6): e0005626.

Rosenzweig, D., D. Smith, F. Oppenheimer, S. Stern, R. W. Olafson and D. Zilberstein (2008). "Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage." FASEB J **22**(2): 590-602.

Sacks, D. and S. Kamhawi (2001). "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis." Annu Rev Microbiol **55**: 453-483.

Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." Nat Rev Immunol **2**(11): 845-858.

Scharton-Kersten, T., L. C. Afonso, M. Wysocka, G. Trinchieri and P. Scott (1995). "IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis." J Immunol **154**(10): 5320-5330.

Sharifi, I., A. R. FeKri, M. R. Aflatonian, A. Khamesipour, A. Nadim, M. R. Mousavi, A. Z. Momeni, Y. Dowlati, T. Godal, F. Zicker, P. G. Smith and F. Modabber (1998). "Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran." Lancet **351**(9115): 1540-1543.

- Sharma, U. and S. Singh (2008). "Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control." J Vector Borne Dis **45**(4): 255-272.
- Sharma, V., P. Sharma, A. Selvapandiyan and P. Salotra (2016). "Leishmania donovani-specific Ub-related modifier-1: an early endosome-associated ubiquitin-like conjugation in Leishmania donovani." Mol Microbiol **99**(3): 597-610.
- Sheng, Y., J. H. Hong, R. Doherty, T. Srikumar, J. Shloush, G. V. Avvakumov, J. R. Walker, S. Xue, D. Neculai, J. W. Wan, S. K. Kim, C. H. Arrowsmith, B. Raught and S. Dhe-Paganon (2012). "A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen." Mol Cell Proteomics **11**(8): 329-341.
- Silva, F. L., R. G. Oliveira, T. M. Silva, M. N. Xavier, E. F. Nascimento and R. L. Santos (2009). "Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis." Vet Parasitol **160**(1-2): 55-59.
- Smith, D. F., C. S. Peacock and A. K. Cruz (2007). "Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases." Int J Parasitol **37**(11): 1173-1186.
- Solano-Gallego, L., G. Miro, A. Koutinas, L. Cardoso, M. G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva, G. Baneth and G. The LeishVet (2011). "LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis." Parasit Vectors **4**: 86.
- Soto, M., S. Iborra, L. Quijada, C. Folgueira, C. Alonso and J. M. Requena (2004). "Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*." Biochem J **379**(Pt 3): 617-625.
- Spath, G. F. and S. M. Beverley (2001). "A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation." Exp Parasitol **99**(2): 97-103.
- Sundar, S. and M. Rai (2002). "Advances in the treatment of leishmaniasis." Curr Opin Infect Dis **15**(6): 593-598.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-577.
- Symmers, W. (1960). "Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain." The Lancet **1**: 127-132.

- Tetreault, G. E., A. E. Zayed, H. A. Hanafi, G. M. Beavers and B. C. Zeichner (2001). "Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East." J Am Mosq Control Assoc **17**(1): 23-27.
- Tselentis, Y., A. Gikas and B. Chaniotis (1994). "Kala-azar in Athens basin." Lancet **343**(8913): 1635.
- Turco, S. J. and D. L. Sacks (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 91-99.
- Upadhyay, S. C. and A. N. Hegde (2007). "Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease." BMC Biochem **8 Suppl 1**: S12.
- Walker, D. M., S. Oghumu, G. Gupta, B. S. McGwire, M. E. Drew and A. R. Satoskar (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites." Cell Mol Life Sci **71**(7): 1245-1263.
- Winter, G., M. Fuchs, M. J. McConville, Y. D. Stierhof and P. Overath (1994). "Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid." J Cell Sci **107 ( Pt 9)**: 2471-2482.
- Wishart, T. M., C. A. Mutsaers, M. Riessland, M. M. Reimer, G. Hunter, M. L. Hannam, S. L. Eaton, H. R. Fuller, S. L. Roche, E. Somers, R. Morse, P. J. Young, D. J. Lamont, M. Hammerschmidt, A. Joshi, P. Hohenstein, G. E. Morris, S. H. Parson, P. A. Skehel, T. Becker, I. M. Robinson, C. G. Becker, B. Wirth and T. H. Gillingwater (2014). "Dysregulation of ubiquitin homeostasis and beta-catenin signaling promote spinal muscular atrophy." J Clin Invest **124**(4): 1821-1834.
- Yanagitani, K., S. Juszkiwicz and R. S. Hegde (2017). "UBE2O is a quality control factor for orphans of multiprotein complexes." Science **357**(6350): 472-475.
- Zilberstein, D. and M. Shapira (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **48**: 449-470.